

# **Dimerization and DNA binding of auxin response factors**

Tim Ulmasov<sup>2</sup> Gretchen Hagen and Tom J. Guilfoyle\*  
Department of Biochemistry, 117 Schweitzer Hall,  
University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA

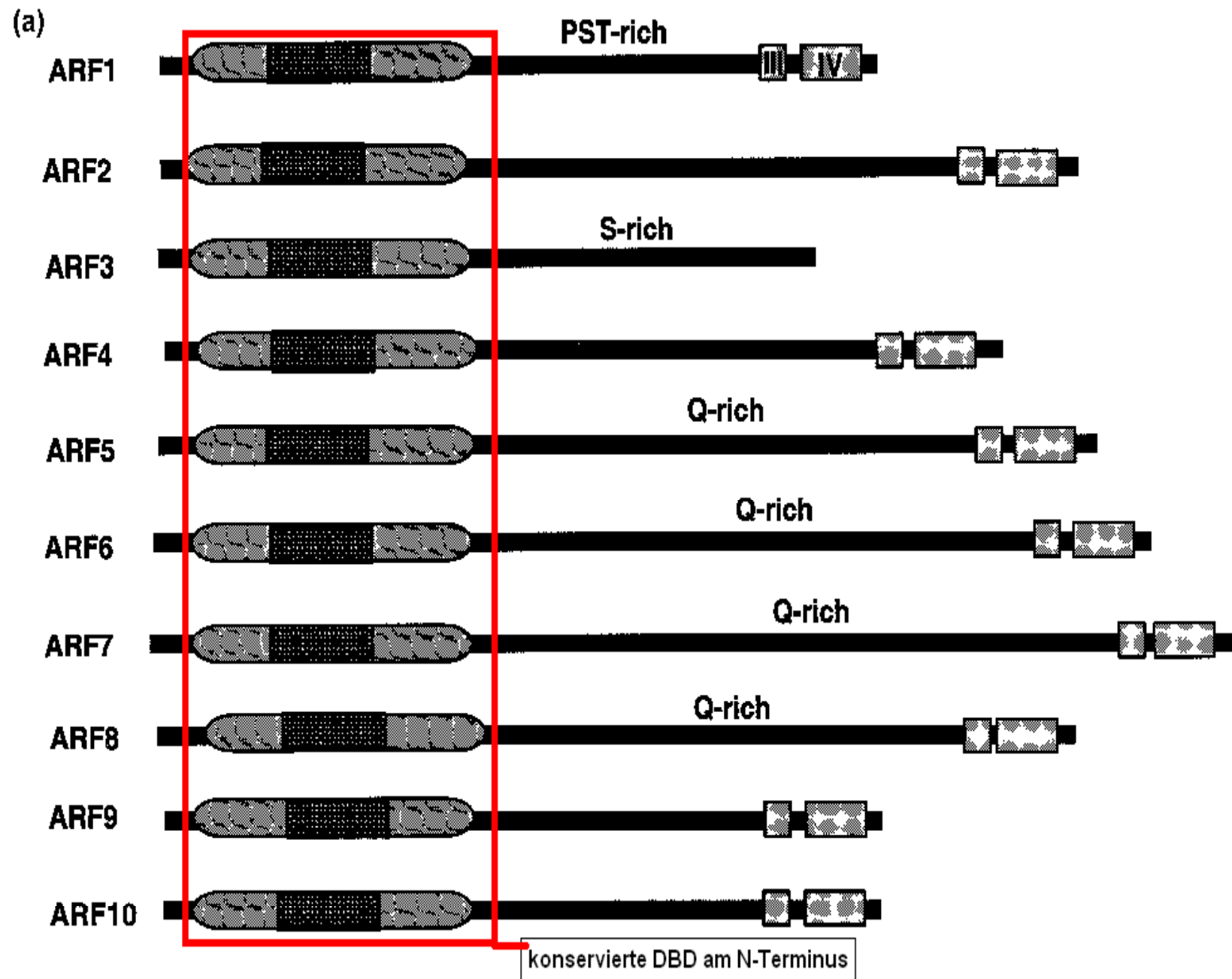
The Plant Journal (1999) 19(3), 309-319

# Ziel

- Wie werden spezifische ARFs zu verschiedenen AuxREs geführt?
- Analyse der Expressionsmuster der *ARF* genes und der Protein-Protein-Interaktionen in *Arabidopsis thaliana*

# Hintergründe:

- ARFs binden spezifisch an TGTCTC-Sequenz in AuxREs (Palindrom)
- AS-Sequenzen von ARF1-ARF10 bekannt
- Protein-Protein-Interaktionen der ARF- und Aux/IAA-Proteinfamilien



(a)

ARF1

ARF2

ARF3

ARF4

ARF5

ARF6

ARF7

ARF8

ARF9

ARF10

PST-rich

S-rich

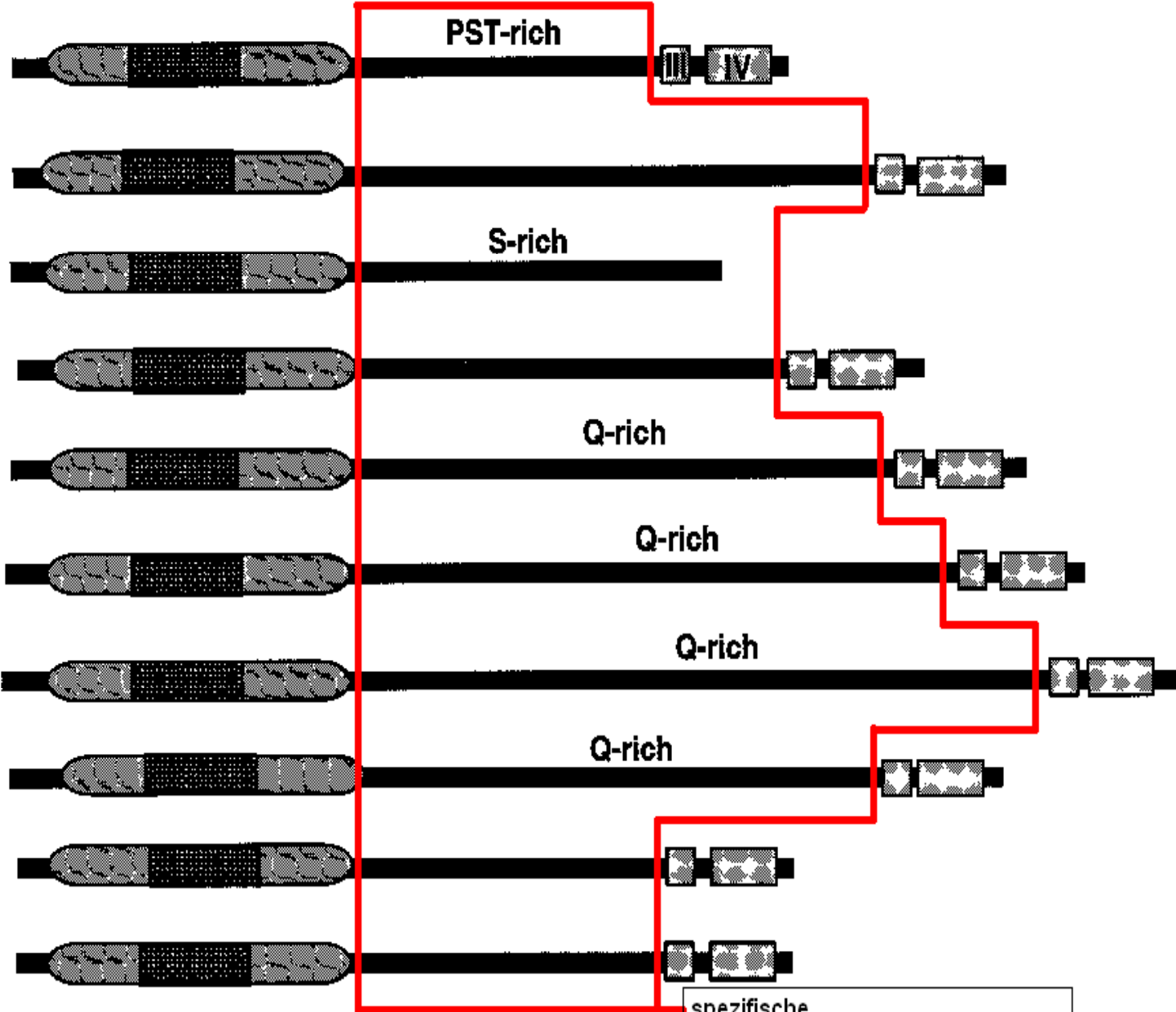
Q-rich

Q-rich

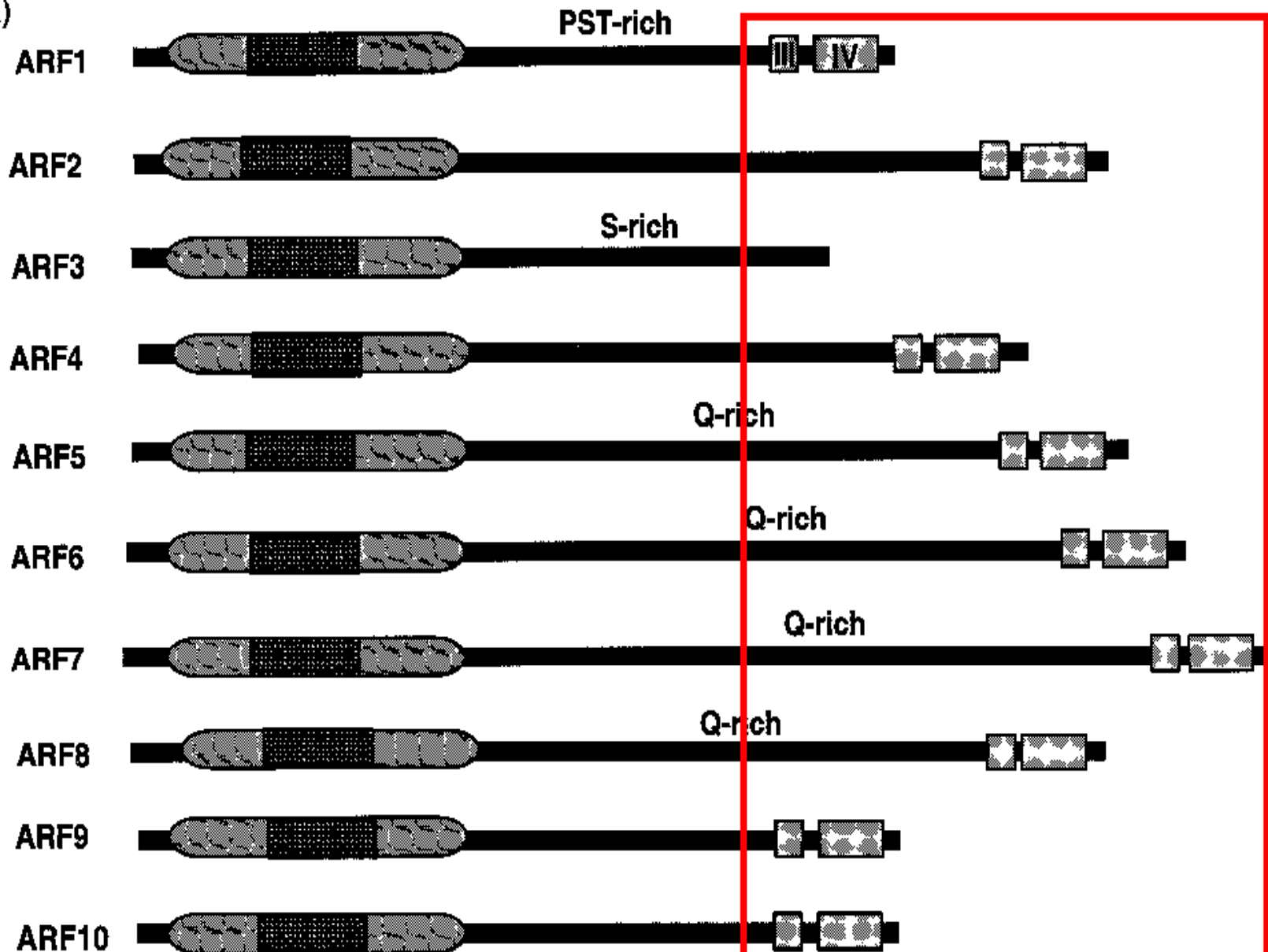
Q-rich

Q-rich

spezifische  
Aktivierungs-/Repressionsdomänen



(a)



Motive der Dimerisierungsdomänen  
am C-Terminus

(b)

ARF1	MAASNHS	-----SGKPGGVLS	-----ALCR	21
ARF2	MASSEVSMKGNRGGDNFSSSGFSDPKETRNVSVAGEGQKSNSTRSAAAERALDPEAAALYR			60
ARF3	-----MGGLIDLNVMETEEDETQTOTQTPSSASGSVSPTSSSSSSASVSVSNSAGGGVCL			53
4	MEFDLNTETIAEVEEEEENDDVGVGVGGGTRIDKGRLGISPSSSSSSSSSSSSSSTGSASSIYS			64
ARF5	-----MMASLSCVEDKMKTSCLVNGGGTITTTTTSQSTLLEEMKLLKDQSGTRKPVINS			53
ARF6	-----	MR-LSSAGFNPOPHGEKEKRVINS		22
ARF7	-----	MKAPSSNGVSPNPVEGERRNINS		23
ARF8	-----	MK-LSTSGLGQOGHEGEKC-LNS		21
ARF9	MA-----NRGGEY-----		LYD	11
ARF10	-----	-----MEQEKSLDP		9
ARF1	ELWHACAGPLVTLPREGCEVYVYFPEGHMEQLEASMHOGLEQQMPSF-NLPSTKTLCKVINI			80
ARF2	ELWHACAGPTVTVPRODDRVEFYFPOGHIEQVEASTNQAAEQQMELY-DLPSTKTLCKVINI			119
ARF3	ELWHACAGPLISLPKRGSLVLVYFPOGHLEO-----APDFSAAIYGLPPHVFICRILDV			105
ARF4	ELWHACAGPLTCLPKKCNVYVYFPOGHLEO-DAMVSYSPPLEIEKF-DLNPQIVCRVNV			122
ARF5	ELWHACAGPLVCLPQVGSLLVYVYFPOGHSEQVAVSTRRSATTOVENYPNLESOLMCQVHNV			113
ARF6	ELWHACAGPLVSLPVGSRVYVYFPOGHSEQVASTNKEVDHAIENYPSLHFOITCQVHNV			82
ARF7	ELWHACAGPLISLPAGSLVYVYFPOGHSEQVASTNKEVDHAIENYPSLHFOITCQVHNV			82
ARF8	ELWHACAGPLVSLPSSGSVYVYFPOGHSEQVASTNKEVDHAIENYPSLHFOITCQVHNV			81
ARF9	ELWKLACAGPLVDVPAQQRVYVYFPOGHMEQLEASTNQVDLNTMKPLFVLPKILCNVMNV			71
ARF10	QLWHACAGSMVOIPSLNSTVFYFAOGHTTEHAHA-----PPDFHAPR--VPPELILCRVVS			62
ARF1	ORRAEPETDEEYAOITTLLELDOSE-----PTSPDAPVOEPEKCTVHSFCKTTLT			129
ARF2	DLKAEADTDEEYAOITTLLEPEANODE-----NAIEKEAPLPPPPRFQVHSFCKTTLT			169
ARF3	KLHAEATTTDEEYAOITTLLEPEANODE-----NAIEKEAPLPPPPRFQVHSFCKTTLT			164
ARF4	QLLANKDITDEEYAOITTLLEPEANODE-----NAIEKEAPLPPPPRFQVHSFCKTTLT			182
ARF5	TLHADKDSDEIYAOITTLLEPEANODE-----NAIEKEAPLPPPPRFQVHSFCKTTLT			163
ARF6	TMHADVETDEEYAOITTLLEPEANODE-----NAIEKEAPLPPPPRFQVHSFCKTTLT			132
ARF7	TMHADVETDEEYAOITTLLEPEANODE-----NAIEKEAPLPPPPRFQVHSFCKTTLT			132
ARF8	TMHADVETDEEYAOITTLLEPEANODE-----NAIEKEAPLPPPPRFQVHSFCKTTLT			131
ARF9	SLQAEKDTDEEYAOITTLLEPEANODE-----NAIEKEAPLPPPPRFQVHSFCKTTLT			121
ARF10	KFLADAETDEEYAOITTLLEPEANODE-----NAIEKEAPLPPPPRFQVHSFCKTTLT			120
ARF1	ASDTSTHGGFSVLRRHADDCLEPPLDMSQOPPWOELVATDLHNSFWHFRHIFRGOPRRHLL			189
ARF2	ASDTSTHGGFSVLRRHADDCLEPPLDMSQOPPWOELVATDLHNSFWHFRHIFRGOPRRHLL			229
ARF3	ASDTSTHGGFSVPRRAEDCFAPLDYKQORPSOELLAKDLHGVWKFRRHIYRGOPRRHLL			224
ARF4	ASDTSTHGGFSVPRRAEDCFAPLDYKQORPSOELLAKDLHGVWKFRRHIYRGOPRRHLL			242
ARF5	ASDTSTHGGFSVPRRAEDCFAPLDYKQORPSOELLAKDLHGVWKFRRHIYRGOPRRHLL			223
ARF6	ASDTSTHGGFSVPRRAEDCFAPLDYKQORPSOELLAKDLHGVWKFRRHIYRGOPRRHLL			192
ARF7	ASDTSTHGGFSVPRRAEDCFAPLDYKQORPSOELLAKDLHGVWKFRRHIYRGOPRRHLL			192
ARF8	ASDTSTHGGFSVPRRAEDCFAPLDYKQORPSOELLAKDLHGVWKFRRHIYRGOPRRHLL			191
ARF9	ASDTSTHGGFSVPRRAEDCFAPLDYKQORPSOELLAKDLHGVWKFRRHIYRGOPRRHLL			181
ARF10	QSDANNNGGGFSVPRRAEDCFAPLDYKQORPSOELLAKDLHGVWKFRRHIYRGOPRRHLL			180
ARF1	TTGWSVVFVSSKKLVAGDAFIFLIRGENEELRVGVRRHMRQOTNIPSSSVISSHSMHIGVLAT			249
ARF2	OSGWSVVFVSSKKLVAGDAFIFLIRGENEELRVGVRRHMRQOTNIPSSSVISSHSMHIGVLAT			289
ARF3	TTGWSVVFVSSKKLVAGDAFIFLIRGENEELRVGVRRHMRQOTNIPSSSVISSHSMHIGVLAT			284
ARF4	TTGWSVVFVSSKKLVAGDAFIFLIRGENEELRVGVRRHMRQOTNIPSSSVISSHSMHIGVLAT			301
ARF5	TTGWSVVFVSSKKLVAGDAFIFLIRGENEELRVGVRRHMRQOTNIPSSSVISSHSMHIGVLAT			283
ARF6	TTGWSVVFVSSKKLVAGDAFIFLIRGENEELRVGVRRHMRQOTNIPSSSVISSHSMHIGVLAT			252
ARF7	TTGWSVVFVSSKKLVAGDAFIFLIRGENEELRVGVRRHMRQOTNIPSSSVISSHSMHIGVLAT			253
ARF8	TTGWSVVFVSSKKLVAGDAFIFLIRGENEELRVGVRRHMRQOTNIPSSSVISSHSMHIGVLAT			252
ARF9	TTGWSVVFVSSKKLVAGDAFIFLIRGENEELRVGVRRHMRQOTNIPSSSVISSHSMHIGVLAT			241
ARF10	TTGWSVVFVSSKKLVAGDAFIFLIRGENEELRVGVRRHMRQOTNIPSSSVISSHSMHIGVLAT			250
ARF1	AAHAITITGTIFSVFYKPRTSRSEFIVSVNRYLEAK-TQKL SVGMRFKMRFE GEEAPEKRE			308
ARF2	AAHAITITGTIFSVFYKPRTSRSEFIVSVNRYLEAK-TQKL SVGMRFKMRFE GEEAPEKRE			348
ARF3	VAAHAISTHVSFISISYKPKASWSNFIIIPAPKELKV-DYPPFCIGMRFKMRFE SEDASERRS			343
ARF4	VAAHAISTHVSFISISYKPKASWSNFIIIPAPKELKV-DYPPFCIGMRFKMRFE SEDASERRS			360
ARF5	AAHAITANRTPELFIYFNPRACPAEFVPLAKYKRAICGSQSVGMRFKMRFE TEDSGKRRY			343
ARF6	AAHAITANRTPELFIYFNPRACPAEFVPLAKYKRAICGSQSVGMRFKMRFE TEDSGKRRY			312
ARF7	AAHAITANRTPELFIYFNPRACPAEFVPLAKYKRAICGSQSVGMRFKMRFE TEDSGKRRY			311
ARF8	AAHAITANRTPELFIYFNPRACPAEFVPLAKYKRAICGSQSVGMRFKMRFE TEDSGKRRY			311
ARF9	AAHAITANRTPELFIYFNPRACPAEFVPLAKYKRAICGSQSVGMRFKMRFE TEDSGKRRY			298
ARF10	AAHAITANRTPELFIYFNPRACPAEFVPLAKYKRAICGSQSVGMRFKMRFE TEDSGKRRY			335
ARF1	SGTIVGVQENKSSVWHDGEWRSGLKVRWDETPSSVFRPERVSPWELEPLVANSTPSSQOPPP			368
ARF2	TGCTIVGVQENKSSVWHDGEWRSGLKVRWDETPSSVFRPERVSPWELEPLVANSTPSSQOPPP			409
ARF3	PGTIVGVQENKSSVWHDGEWRSGLKVRWDETPSSVFRPERVSPWELEPLVANSTPSSQOPPP			403
ARF4	AGTIVGVQENKSSVWHDGEWRSGLKVRWDETPSSVFRPERVSPWELEPLVANSTPSSQOPPP			420
ARF5	MCTIVGVQENKSSVWHDGEWRSGLKVRWDETPSSVFRPERVSPWELEPLVANSTPSSQOPPP			403
ARF6	MCTIVGVQENKSSVWHDGEWRSGLKVRWDETPSSVFRPERVSPWELEPLVANSTPSSQOPPP			372
ARF7	MCTIVGVQENKSSVWHDGEWRSGLKVRWDETPSSVFRPERVSPWELEPLVANSTPSSQOPPP			371
ARF8	MCTIVGVQENKSSVWHDGEWRSGLKVRWDETPSSVFRPERVSPWELEPLVANSTPSSQOPPP			371
ARF9	SCTIVGVQENKSSVWHDGEWRSGLKVRWDETPSSVFRPERVSPWELEPLVANSTPSSQOPPP			357
ARF10	FMCTIVGVQENKSSVWHDGEWRSGLKVRWDETPSSVFRPERVSPWELEPLVANSTPSSQOPPP			396

(c)

ARF1	544	CTKVHMQGSAVGRAIDLTRSECYEDLFKKLEEMFDIK-GELLES-----
ARF2	735	CTKVHKQGIAGRSVDLSKFQNYEELVAELDRLEFN-GELMAP-----
ARF4	667	CTKVHKQGSQVGRAIDLRLNGYDDLMELERLFNME-GLLRDP-----
ARF5	795	YTKVQKTGS-VGRSIDVTSFKDYEEELKSAIECMFGL-GLLTHPQ-----
ARF6	796	FVKVYKSGS-FGRSLDISKFSSYHELRSELARMEGLE-GQLEDPV-----
ARF7	1039	YTKVQKRGs-VGRSIDVNRYRGYDELRHDLARMEGIE-GQLEDPO-----
ARF8	707	FVKVYKSGS-VGRSLDISRFSSYHELRREELGKMEFAIE-GLLEDPL-----
ARF9	525	RTKVQMQGVPVGRAVDLNALKGYNELIDDIKLEFDIK-GELR-S-----
IAA1	76	YVKVSMDCAPYLARKIDLKMYKNYPELLKALENMEKFTVGEYSEREGYK-----
IAA2	79	YVKVSMDCAPYLARKIDLKTYKNYPELLKALENMEKVMIGEYCEREGYK-----
IAA3	94	YVKVSMDCAPYLARKIDLSYKGYSELLKALEVMEKFSVGEYFERDGYK-----
IAA5	71	YVKVSVDCGAFLRKIDLEMYKCYQDLASALQILFGCYI--NFD-DTLK-----
IAA7	126	LVKVSMDCAPYLARKVDLKYKSYQDLSDALAKMFSSFTMGNYGAQ--GMIDFMNESKLMNLLN
IAA9	218	FVKVSMDCAPYLARKVDLRSYTNYGELSSALEKMFETFTLQCGSNGAAGKMDLSETKLKDLLN
IAA11	138	FVKVTMDGIPIGRKIDLNAHKCYESLSNTLEEMFLKPKLGSRTLETG-HMETPVKILPDG--
IAA13	130	FIKVNMDGVAIGRKVDLNAHSSYENLAQTLEDMEFRTNPGTVGLTSQF----TKPLRLLDG--
IAA17	112	FVKVSMDCAPYLARKIDLRMYKSYDELSNALSNMESSTFTMGKHGGEE-GMIDFMNERKLMDLVN

motif III

ARF1	587	TKKWQVVYTDDEDDMMVVGDDPWNEFCGMVRKIFIYTPPEEVKKL
ARF2	778	KKDWLIVYTDEENDMMLVGDDPWQEFCCMVRKIFIYTKKEVRKM
ARF4	710	EKGWRILYTDSENDMMVVGDDPWHDFCNVVWKIHLTYKKEVENA
ARF5	838	SSGWKL VYVDYESDVLLVGDDPWEEFVGCVR CIRILSPTEVQQM
ARF6	839	RSGWQLVFVDRENDVLLLGGDPWPEFVSSVWC IKILSPQEVQQM
ARF7	1082	TSDWKL VYVDHENDILLVGDDPWEEFVNCVQSIKILSSAEVQQM
ARF8	750	RSGWQLVFVDKENDILLGGDPWESFVNNVWYIKILSPEDVHQM
ARF9	567	RNQWEIVFTDDEGDMMLVGDDPWPEFCNMVKRIFIWSKEEVKKM
IAA1	124	GSGFVPTYEDKDGDWMLVGDPWDMFSSSCQKLRI MKGSEAPTA
IAA2	127	GSGFVPTYEDKDGDWMLVGDPWDMFSSSCKRLRI MKGSDAPAL
IAA3	142	GSDFVPTYEDKDGDWMLIGDVPWEMFICTCKRLRI MKGSEAKGL
IAA5	116	ESECVP IYEDKDGDWMLAGDVPWEMFLGSCCKRLRI MKRSCNRG
IAA7	187	SSEYVPSYEDKDGDWMLVGDPWEMFVESCKRLRI MKGSEAVGL
IAA9	281	GKDYVLTYEDKDGDWMLVGDPWEMFIDVCKKLKI MKGCD AIGL
IAA11	198	SSGLVLTYEDKEGDWMLVGDPWGMFIGSVRRLRI MKTSEATGK
IAA13	187	SSEFVLTYEDKEGDWMLVGDPWRMFINSVKRLRV MKTSEANGL
IAA17	174	SWDYVPSYEDKDGDWMLVGDPWPMFVDTCKRLRI MKGSDAIGL

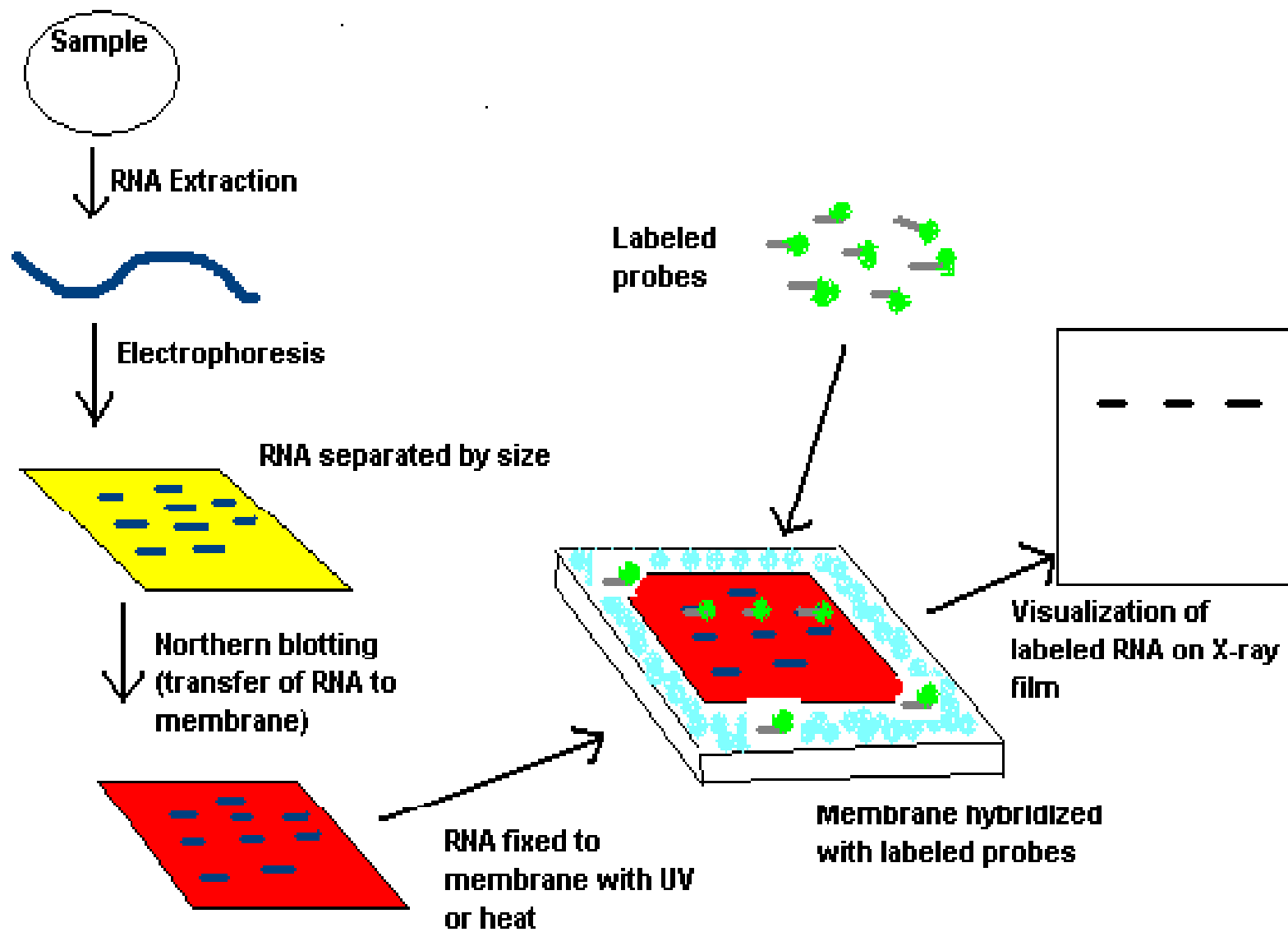
motif IV



# Expression profiles of *ARF* genes in *Arabidopsis*

## Experiment:

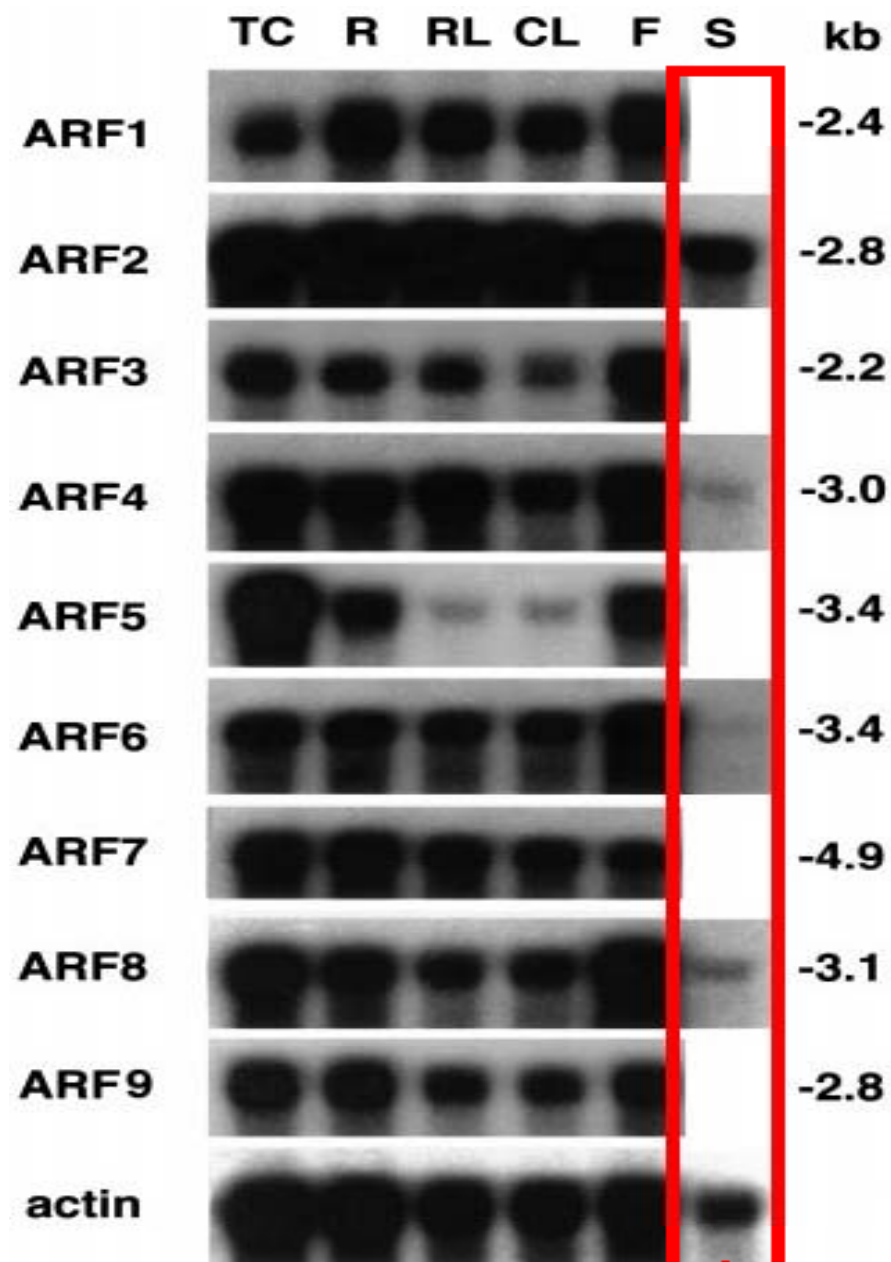
- Analyse der Expressionsmuster der ARFs mittels Northern blot
- Total-mRNA aus verschiedenen Organen
- Gen-spezifische, markierte cDNA von ARF1-ARF9 zur Hybridisierung



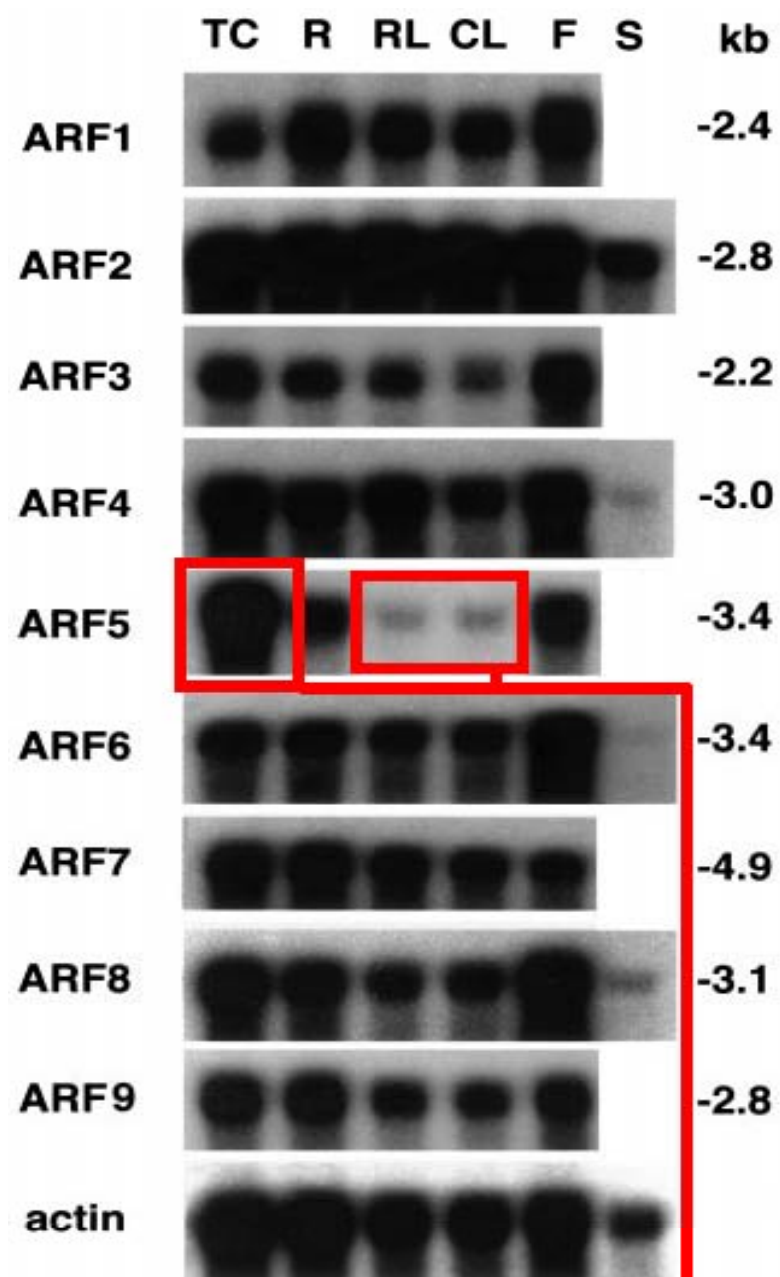
Northern blot

## Ergebnisse:

- Relativ gleich viel mRNA der einzelnen ARFs in Organen bis auf Schoten
- ARF5 hohe Expressionsrate in culture cells (undifferenzierte Zellen), niedrig in Rosetten- und Stängelblättern → evtl. Rolle bei der Entwicklung



niedrige bis gar keine Expression der ARFs  
(bis auf ARF2) in Schoten



hohe Expressionsrate in cultured cells, niedrig in  
Rosetten-/Stängelblättern

- Experiment keine Aussage, dass verschiedene ARFs gleichermaßen in spezifischen Geweben oder Zelltypen der einzelnen Organe expremiert werden
- Keine Änderung der mRNA-Menge bei Auxinbehandlung → *ARF* genes keine early auxine response genes

# **Delineation of the amino-terminal boundary of the ARF1 DBD**

Bekannt:

- Deletionen von N-terminalen Fragmenten bis N63 oder N154 → keine DNA-Bindung von ARF1 möglich
- → DBD von ARF2-ARF9 mit DBD von ARF1 verglichen
- → 1. konservierte Sequenz der ARFs ist ELWHACAGPL ab N22



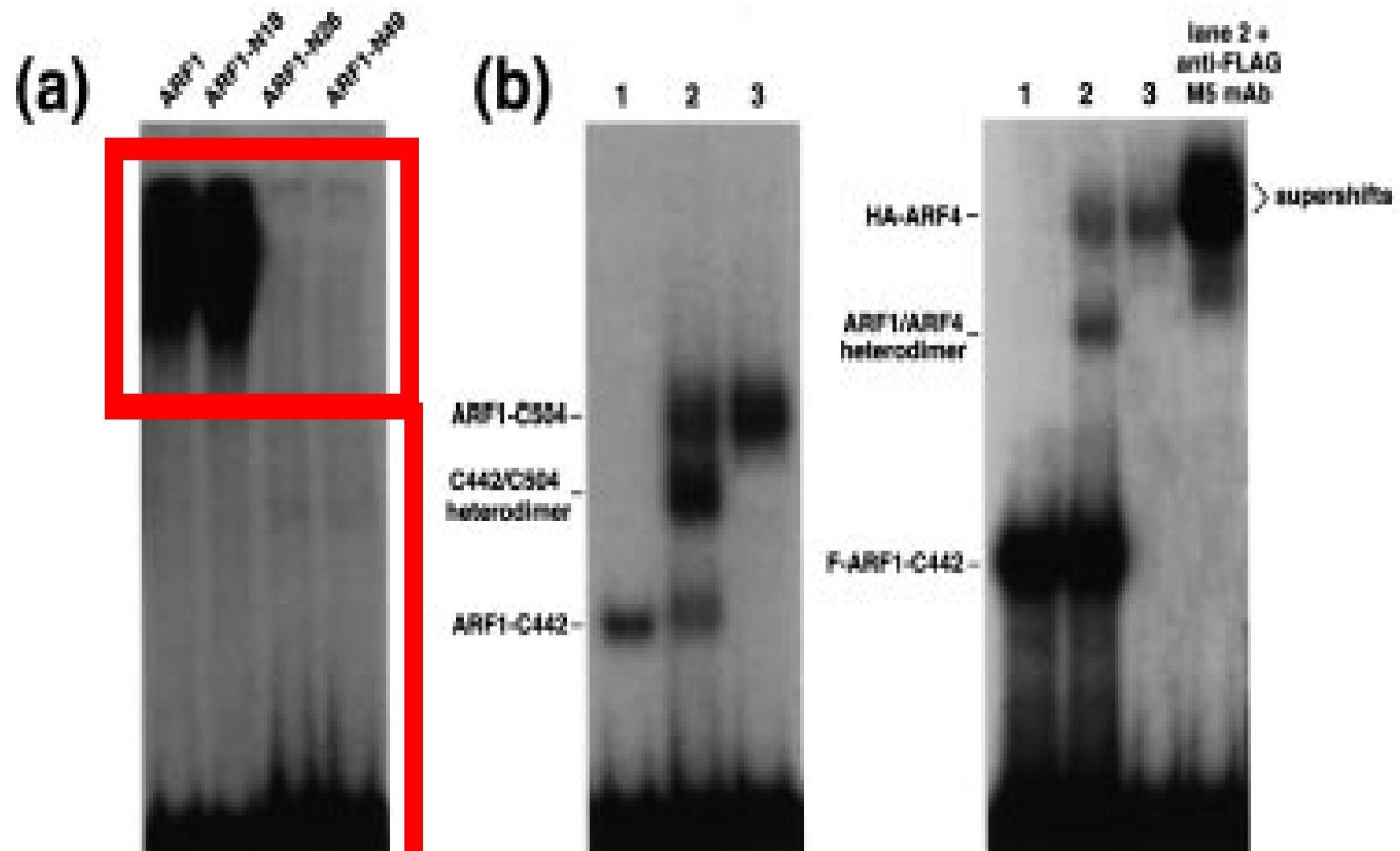


## Experiment:

- Deletionen von 3 N-terminalen Fragmenten von ARF1
- Gel-shift mit N18-, N26-, N49-Deletionen in ARF1

## Ergebnisse:

- Deletionen bis N26 oder N49 → keine DNA-Bindung von ARF1 möglich
- Deletion bei N18 → DNA-Bindung möglich  
→ 1. konservierte Sequenz und N-terminale Grenze der DBD der ARFs (ELWHACAGPL) ab N22



nur N18-Deletion führt noch zur Bindung der DNA

# **ARF1 binds as a dimer to palindromic TGTCTC AuxREs**

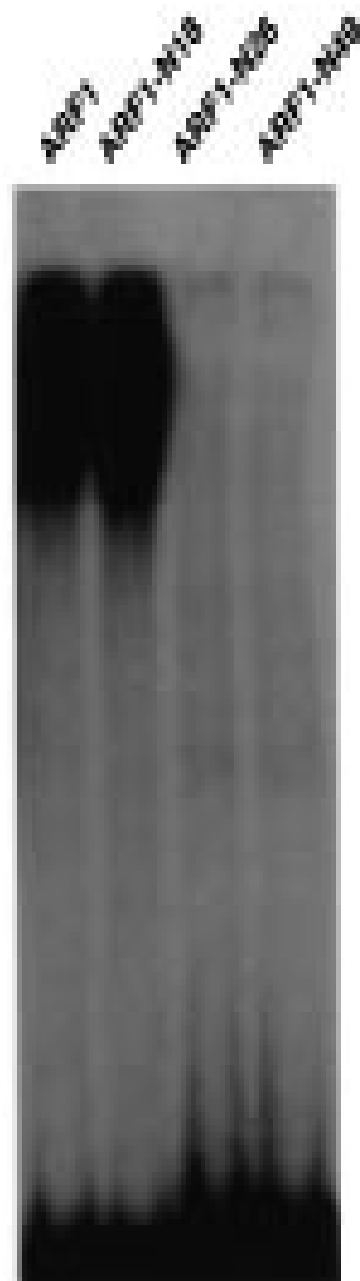
## Experiment:

- Gel mobility shift assay mit ER7 und ARF1-C504, ER7 und ARF1-C442; einzeln und zusammen
- Gel mobility shift assay mit ER7 und ARF1-C442, ER7 und ARF4; einzeln und zusammen
- Supershift mit FLAG- und HA-Epitope Tagging

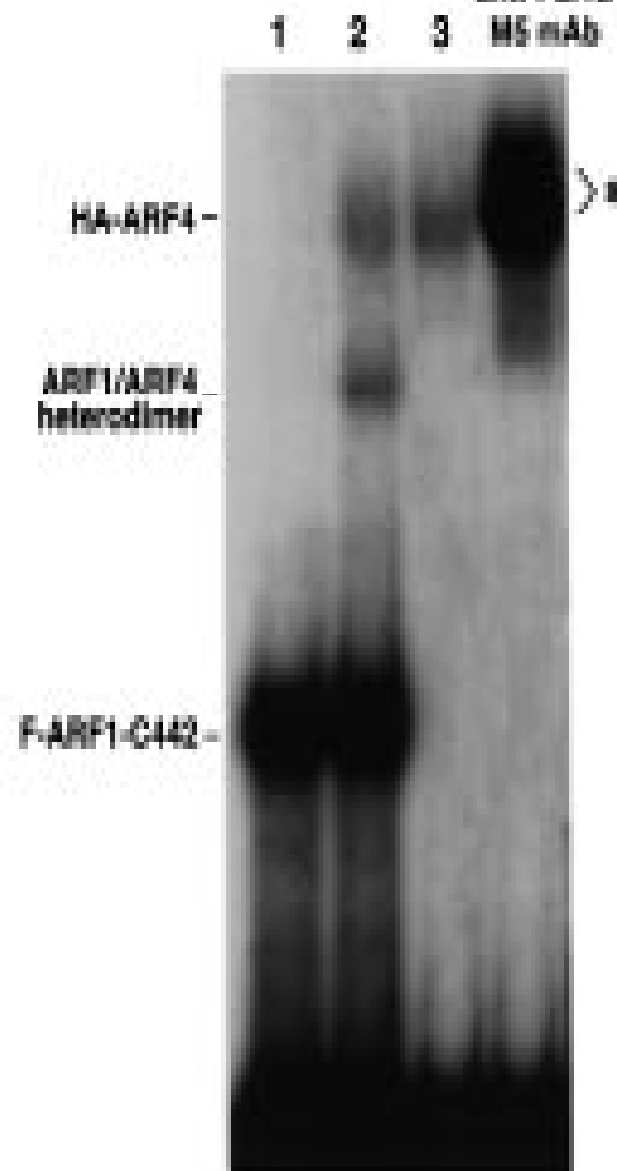
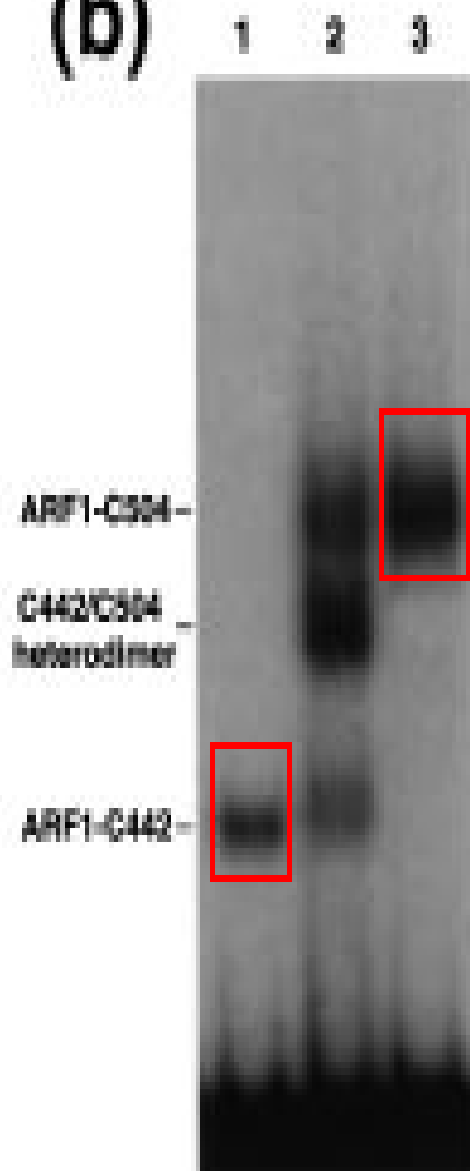
## Ergebnisse:

- ARF1-C504 und ARF1-C442 bilden jeweils unterschiedlich große Komplexe mit ER7
- Beide zusammen mit ER7 ergeben Komplex von mittlerer Größe → Komplex aus ER7 und ARF1-C504/ARF1-C442 als Heterodimer

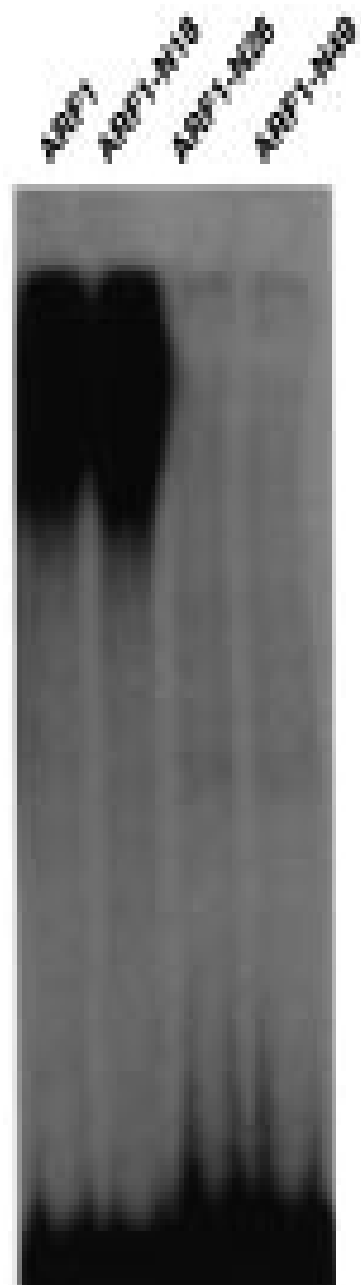
**(a)**



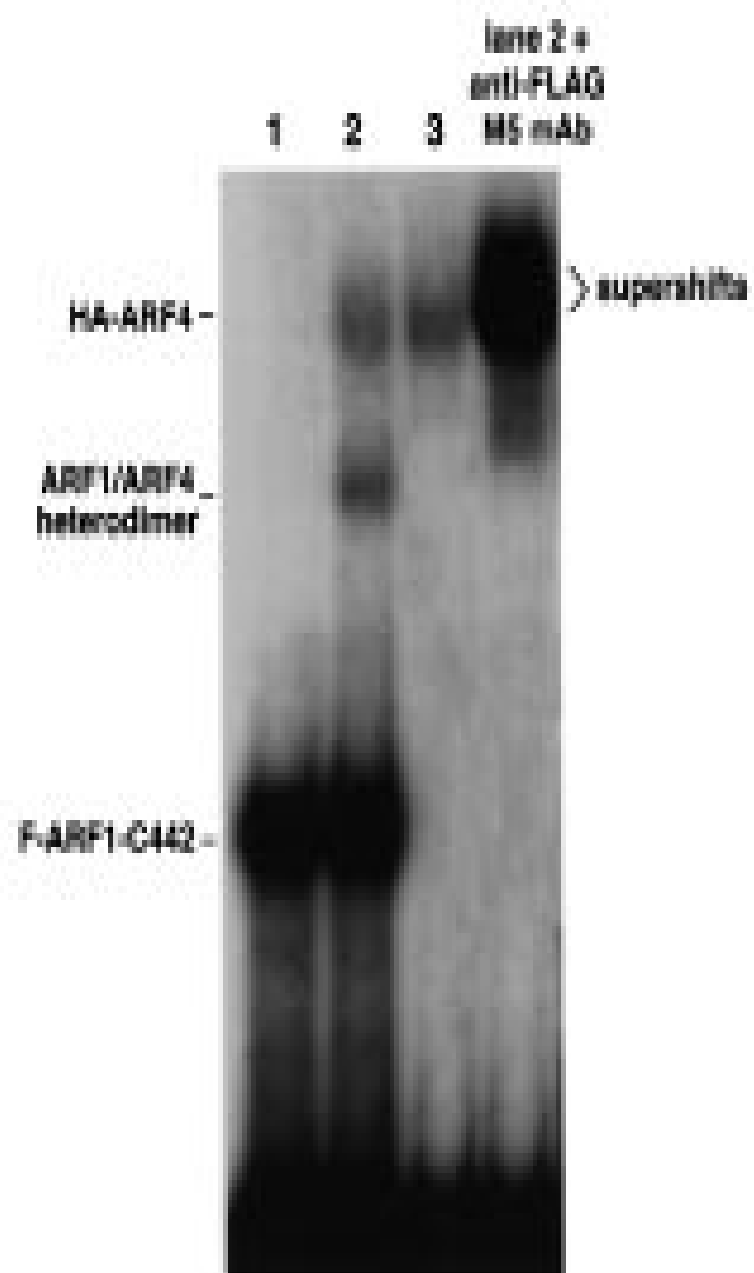
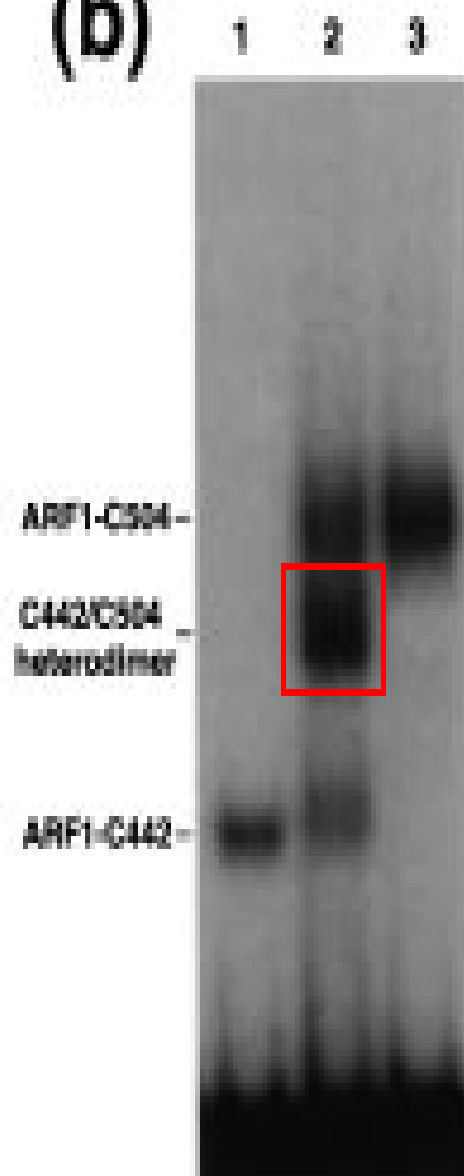
**(b)**



(a)



(b)



- Gel mobility shift assay mit ER7, ARF1-C442 und ARF4 → ebenfalls mittlerer Komplex zu erkennen → Homo-/Heterodimer-Bildung an ER7 einheitlich bei untersuchten ARFs



# Epitope Tagging with Recombinant DNA

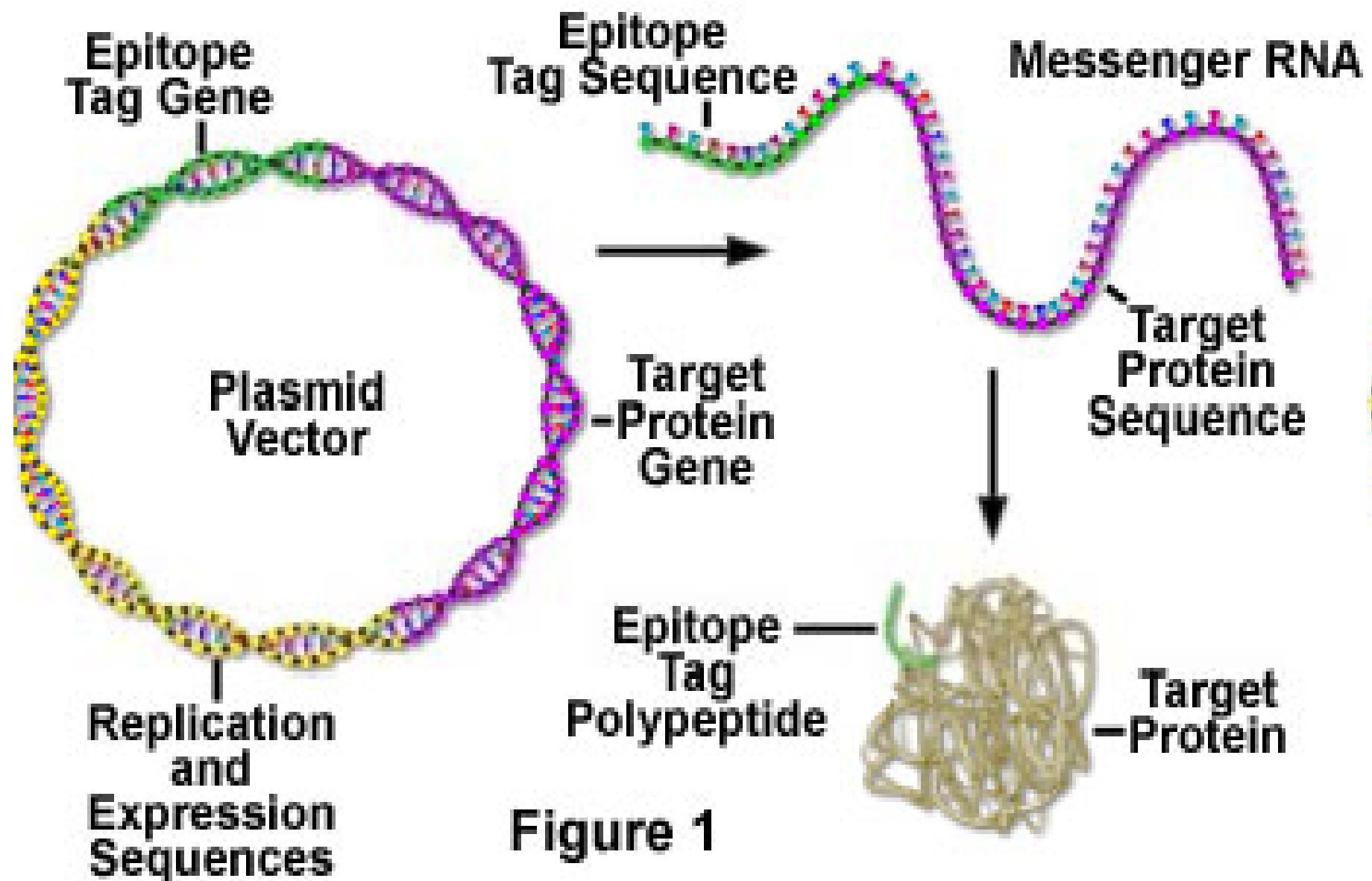


Figure 1

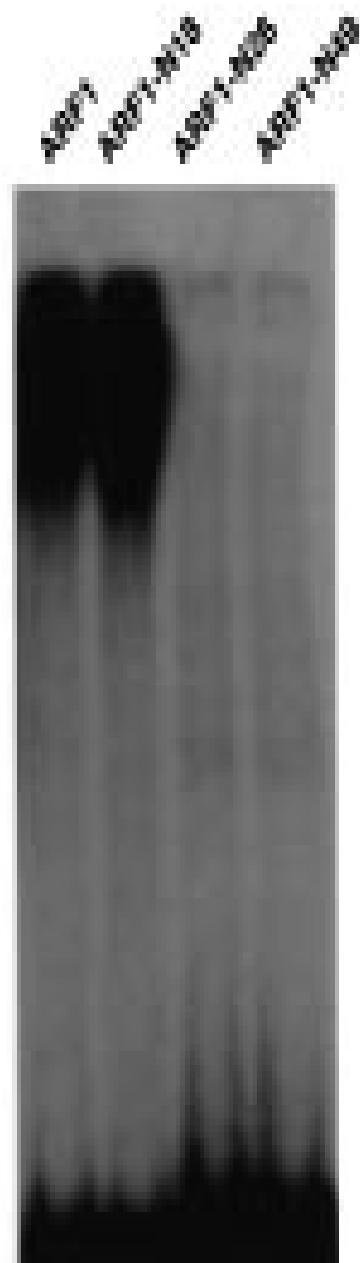
Name	Sequence	Detection	Purification	Reference
FLAG	DYKDDDDK	M1,M2, M5	Immunoaffinity	1
6 x His	HHHHHH	Anti-His	Metal affinity	2
HA	YPYDVPDYA	12CA5	Immunoaffinity	4
c-myc	EQKLISEEDL	9E10	Immunoaffinity	5
GST	220 aa GST	Anti-GST	Glutathione	3
Protein A	IgG-binding domain	IgG	IgG	10
CD	18 aa exon	12CA5	Immunoaffinity	19
Strep-tag	WSAPQFEK	Strep-Tactin	Strep-Tactin	11
MBP	Maltose-binding protein	Anti-MBP	Maltose	13
CBD	Chitin-binding domain	Anti-CBD	Chitin	14
S-tag	S-peptide	Anti-S peptide	S-peptide	16
Avitag	GLNDIFEAQKIEWHE	Avidin	Avidin	12
CBP	CBP peptide	Anti-CBP	Calmodulin	15
TAP	Calmodulin- and IgG-binding domains	Anti-CBP	Calmodulin and IgG	15
SF-TAP	Strep Tag II and FLAG	Anti-FLAG	Strep-Tactin	28

GST, glutathione-S-transferase; CBP, calmodulin-binding peptide.

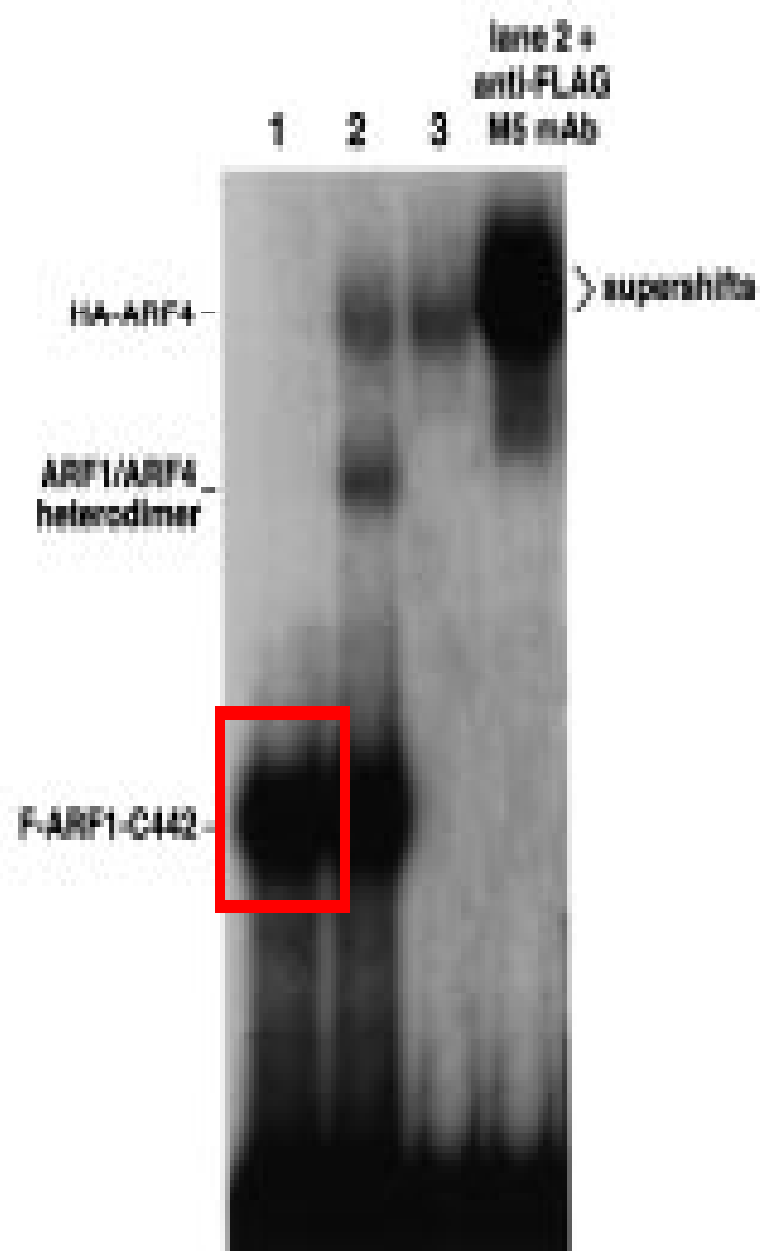
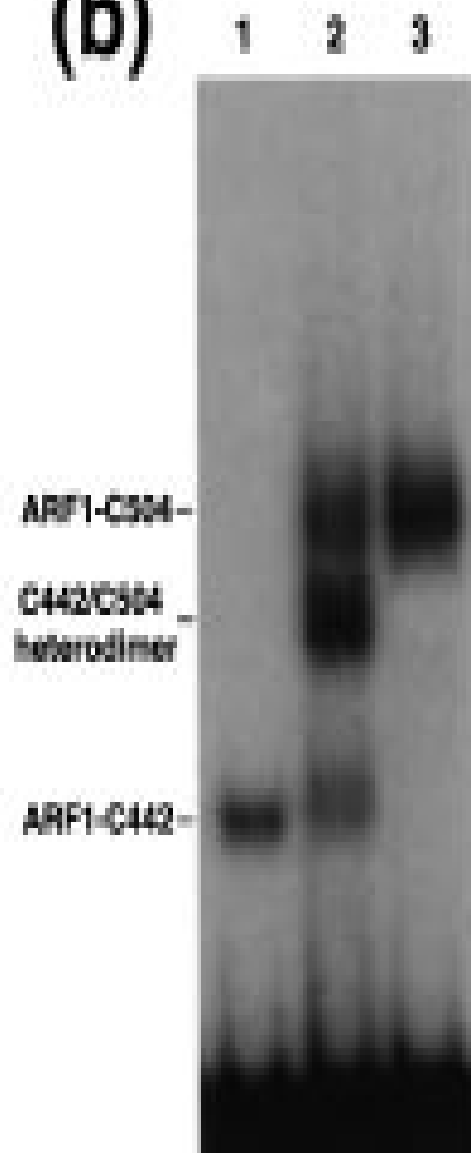
## *Epitope-Tagging*

- Gel shift mit FLAG-tagged ARF1-C442, ER7
- Gel shift mit HA-tagged ARF4, ER7
- Beide tagged ARFs zusammen mit ER7, alles ohne Antikörper (Ab)

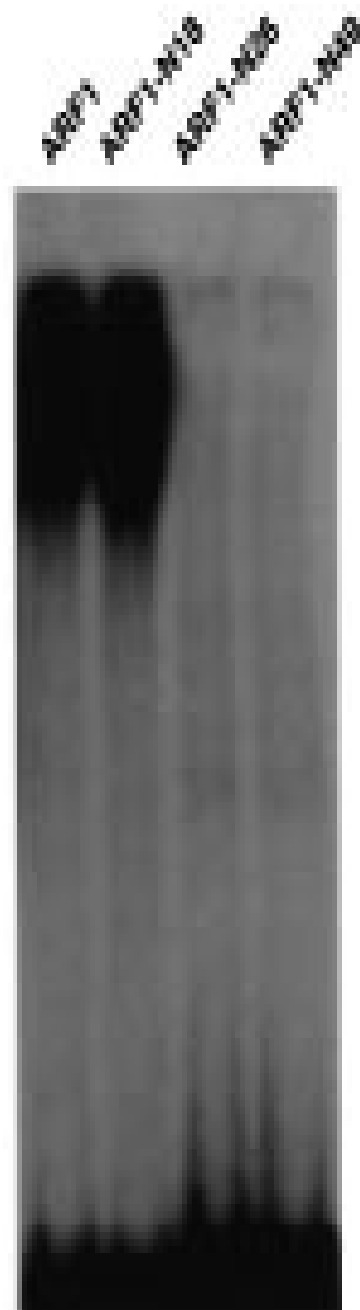
(a)



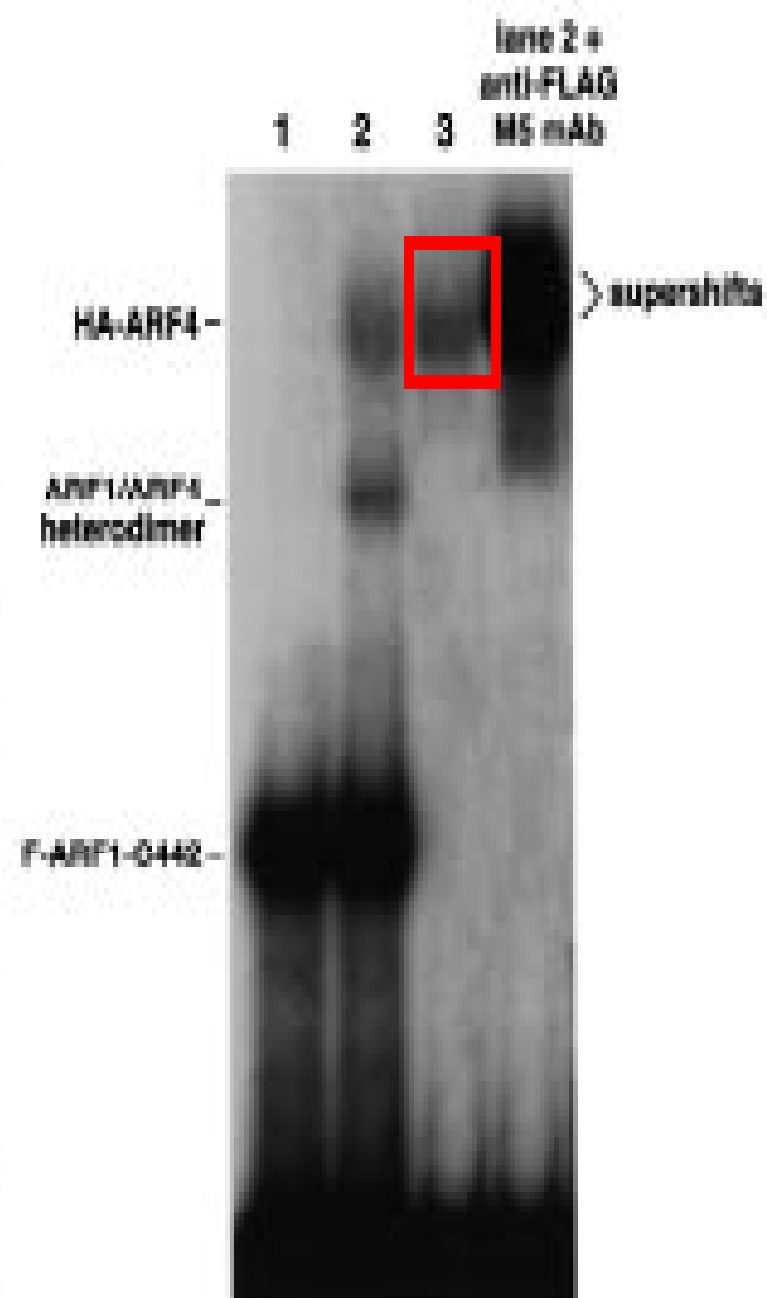
(b)

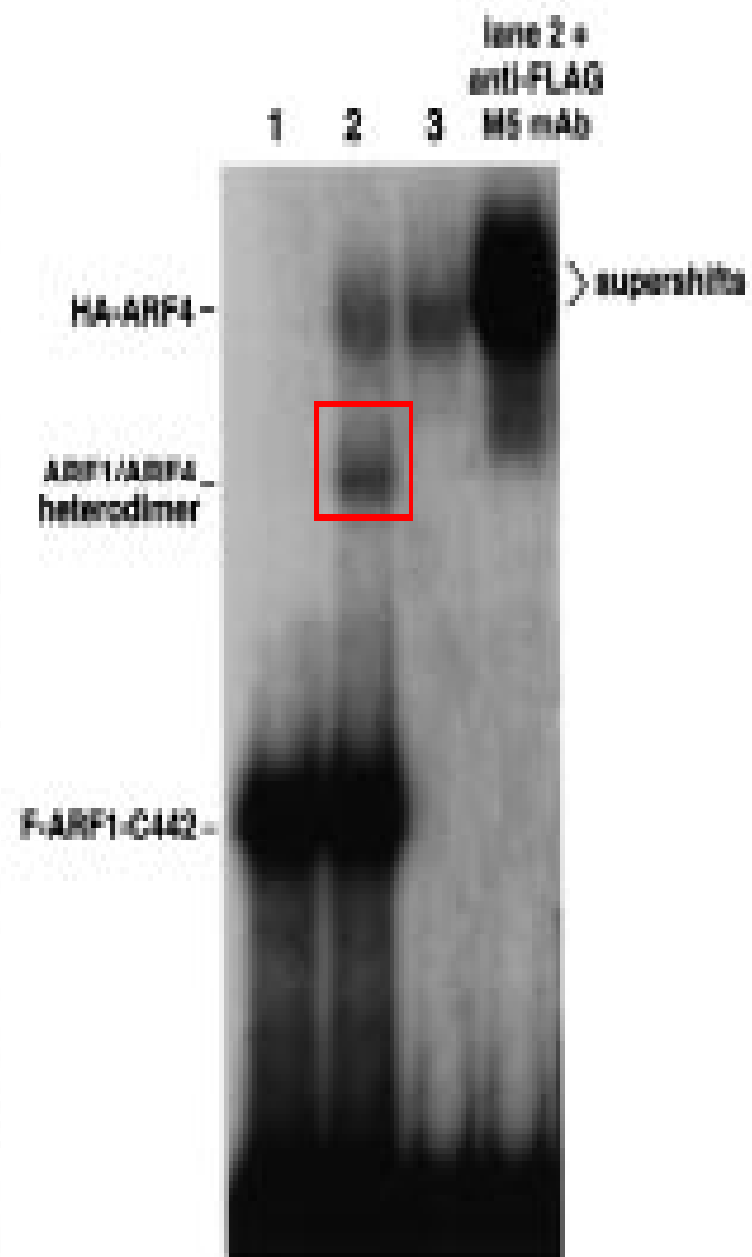
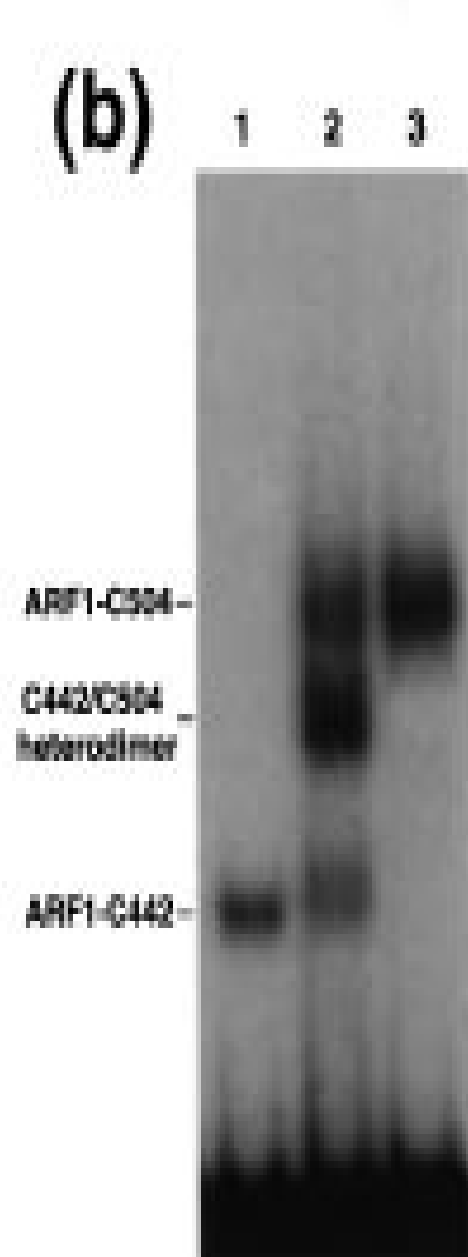
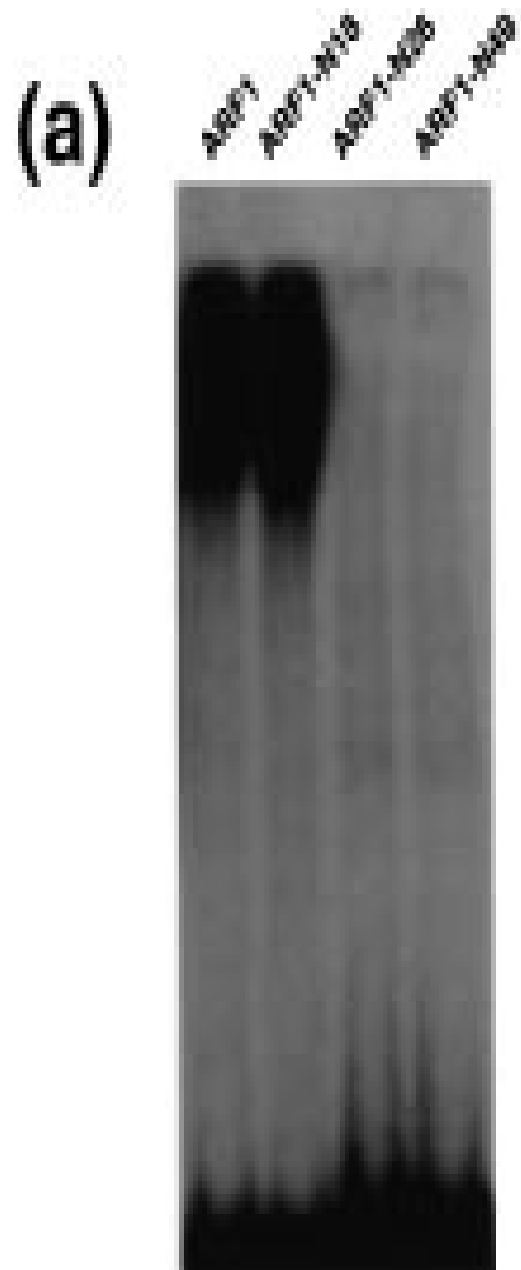


**(a)**



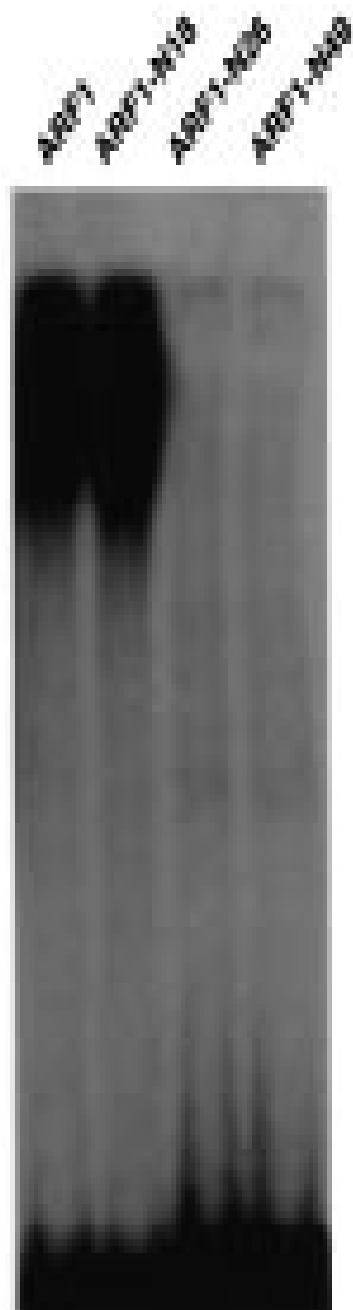
**(b)**



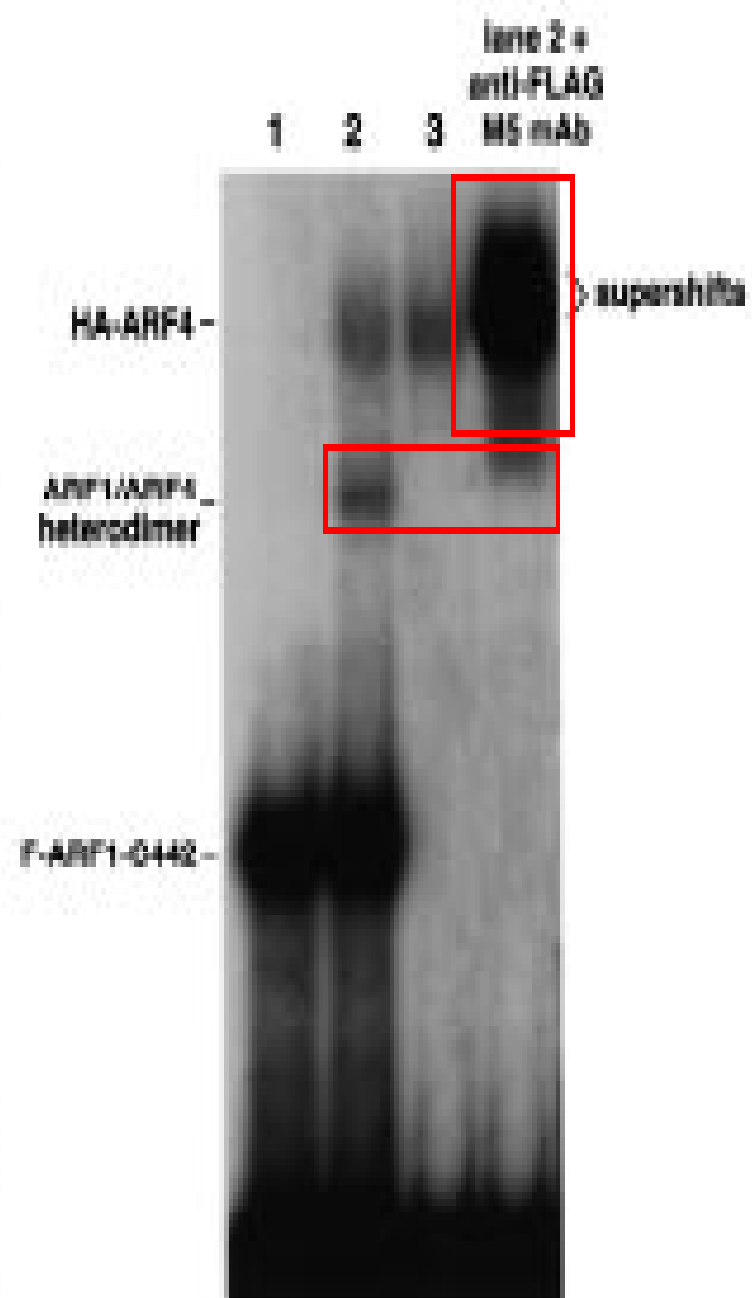


- Supershift mit F-ARF1-C442, anti-FLAG Ab, HA-ARF4, ER7 → nur noch 1 Bande weit oben; F-ARF1-C442/HA-ARF4-Bande weg → F-ARF1-C442 Teil des Dimer-Komplexes an ER7

**(a)**



**(b)**





- Supershift mit HA-ARF4, anti-HA Ab, F-ARF1-C442, ER7  $\rightarrow$  HA-ARF4 Teil des Dimer-Komplexes
- $\rightarrow$  Schluss, beide Teil des Dimer-Komplexes

- Andere Studie → ARF1 größere Affinität zu palindromischem AuxRE als zu einzelner TGTCTC-Sequenz
- → ARF1 und ARF4 binden an palindromisches ER7 AuxRE als Heterodimer

# Nächstes Mal:

**The TIR1 protein of *Arabidopsis*  
functions in auxin response and is  
related to human SKP2 and  
yeast?Grr1p**

Max Ruegger, Elizabeth Dewey, William M. Gray, et al.  
*Genes Dev.* 1998 12: 198-207

Tobias und Christian

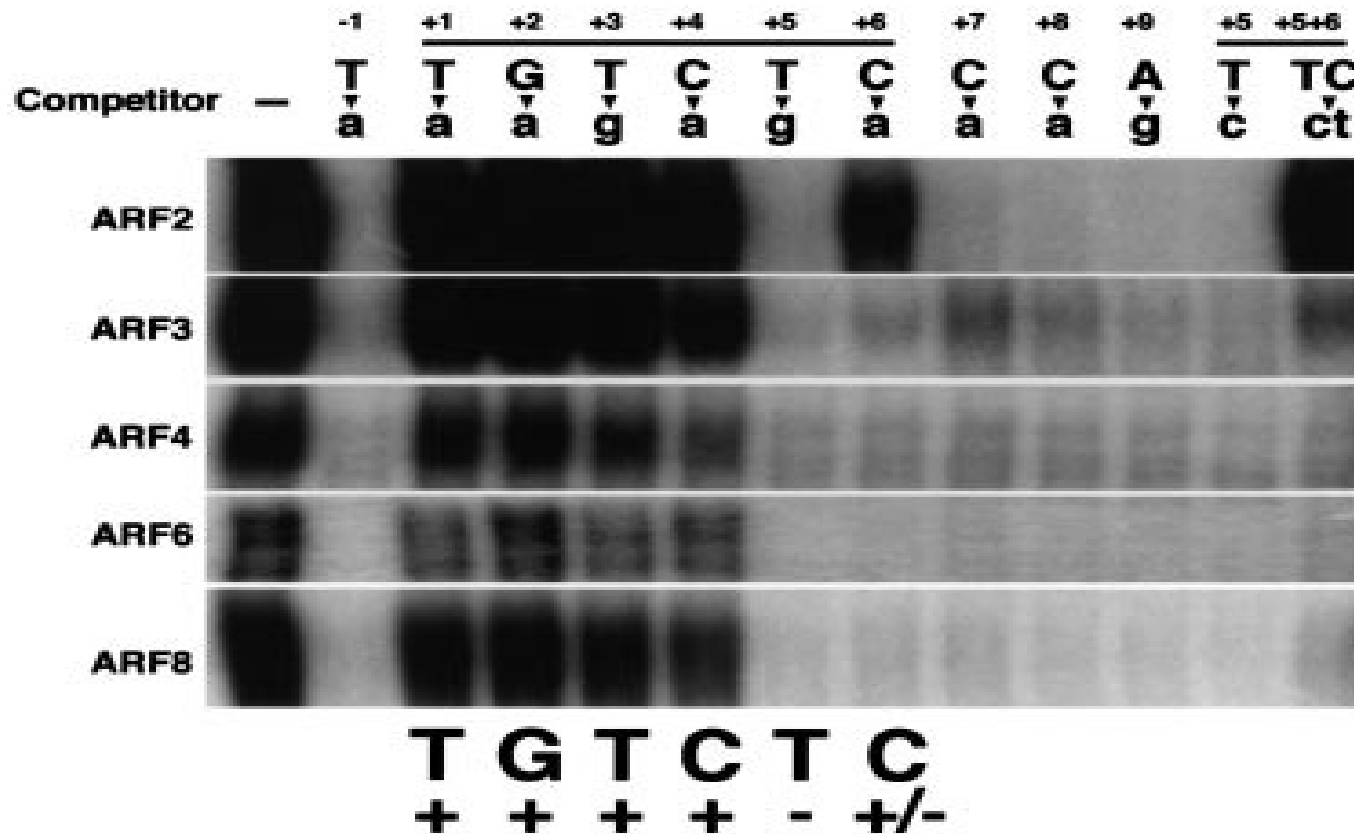
# Spezifische Bindung des ARF Proteins

- ARF 1 und ARF5/IAA24 bindet spezifisch an TGTCTC AuxRE
- Untersuchung, ob auch andere ARF Familien Mitglieder an die selbe DNA-Bindestelle binden (ARF2, ARF3, ARF4, ARF6 und ARF 8), m.H. von mobility shift assay
- dabei wurde das Palindrom P3(4X) verwendet

# Palindrom P3 (4X)

- 3 Kopien vom ER7 AuxRe
- nur 2 von 3 Palindromen können von ARF1 besetzt werden
- durch den Verdeckungseffekt

# Spezifische Bindung des ARFs an das Palindrom TGTCTC AuxRE



# Spezifische Bindung

- Position +4 des Recognition Elements sind erforderlich für die Bindung von ARF2, ARF3, ARF4, ARF6 und ARF8
- Für ARF3 zeigt sich eine supershifted Bande
- Der Austausch einer Base an Position +5 wurde toleriert von 6 ARFs, ähnlich den Ergebnissen von ARF1 und ARF5/IAA24
- Position +6 zeigt einige Variationen zwischen

# Spezifische Bindung

- ARF2 und ARF3 verhielten sich wie ARF1 und ARF5/IAA24
- Daraus folgt, dass Position +6 sehr wichtig für die Bindung ist
- Bindung von ARF2 und ARF3 ist viel mehr beeinträchtigt, wenn eine doppelte Mutation in Position +5 und +6 vorliegt
- Ähnlich wie bei ARF1 und ARF5/IAA24



# Spezifische Bindung

- Im Kontrast dazu, zeigten ARF4 und ARF8 einen kleineren Effekt auf den Verlust der Base an Position +6 oder der Position +5 und +6
- Sowie haben Verluste außerhalb des Palindroms TGTCTC nur kleine Effekte auf die Bindung von ARF2, ARF3, ARF4, ARF6 und ARF8
- Mit der möglichen Ausnahme bei ARF3 an

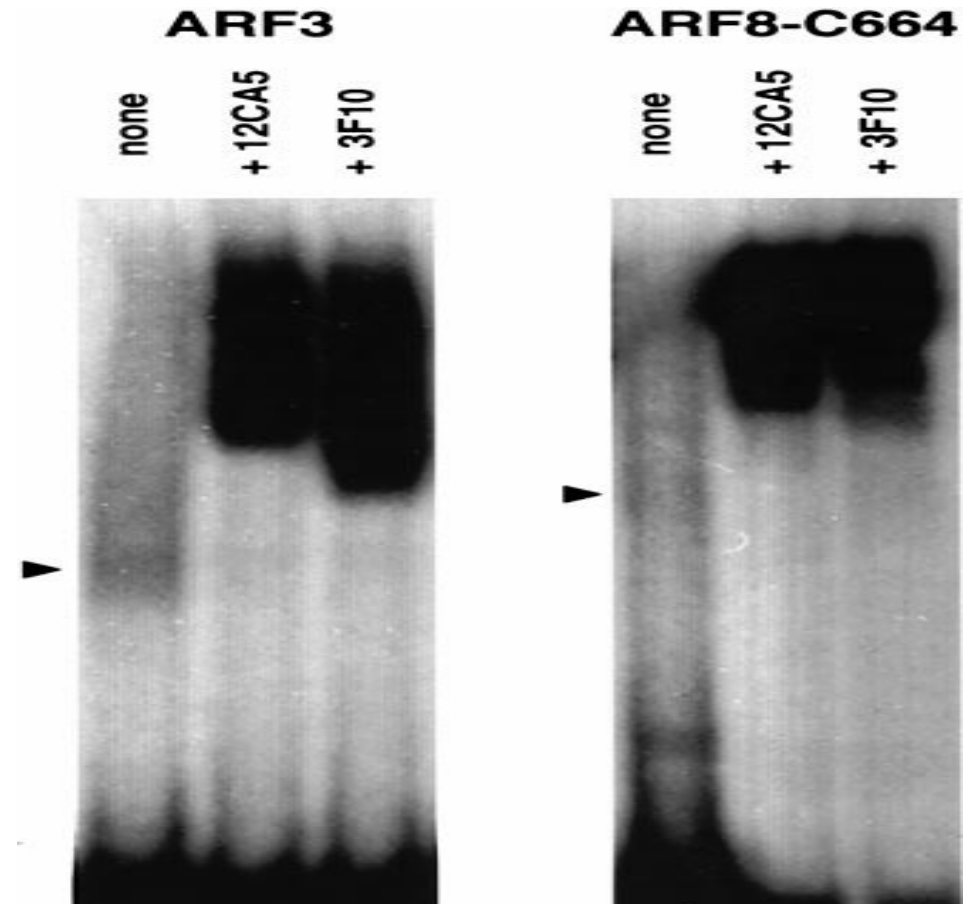
# Spezifische Bindung

- Alles weist darauf hin, dass alle Aminosäure eine Bindung an TGTC (Position +1 bis +4) brauchen um stabil zu binden, aber das TC an Position +5 und +6 ist besonders wichtig, mehr als alle anderen Positionen
-

- ARF3 fehlt es an einer Carboxyl-terminalen Domäne
- Diese Domäne beinhaltet konserviert Motive 3 und 4 (Abbildung 1a)
- ARF3 produzierte in einem Gel shift nur diffuse Schlieren mit P3(4X)

Die Bindung einiger ARFs wird gestört durch einen Carboxyl-terminalen Abbruch

- CTD oder eine artificale Dimerisations Domäne die erforderlich ist für die stabile Bindung von ARF3 und ARF8 an das Palindrom TGTCTC AuxRE



Bindung von ARF3 und ARF8 an  
das Palindrom TGTCTC AuxRE

- Wenn man, aber HA epitope-tagged mit anti HA-epitpe monoklonalem Antikörper mischt entsteht im Gel shift ein intensiver supershifted Komplex
- Kein supershifted Komplex ist zu beobachten wenn man nur die Antikörper mit der Probe mischt
- Das gleiche gilt, wenn man nur Antikörper mit der Probe und ARF mischt

Bindung einiger ARFs

- ARF1 bindet an das Palindrom AuxRE und war unbeeinträchtigt vom Abbruch des CTD
- ARF1 DBD ist definiert durch einen Carboxyl-terminalen Abbruch, der sequenziell vom Motiv 3 und 4 entfernt liegt und die nicht konservierte Mittelregion des ARF1 besitzt
- CTD könnte eine Dimerisations Domäne sein, dies könnte die Bindung einiger ARFs am

Bindung einiger ARFs

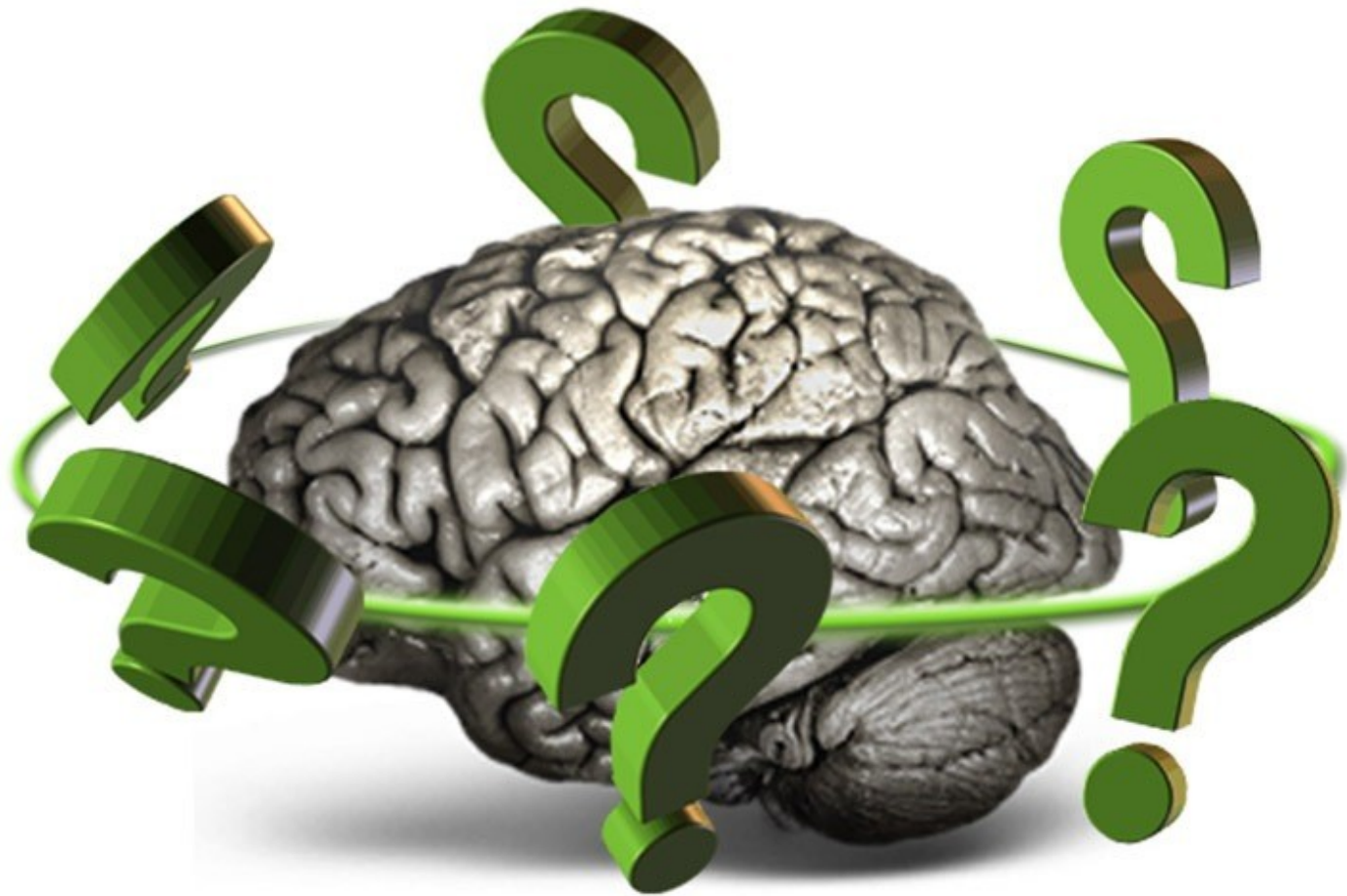
- ARF8 erzeugt eine diffuse Schmiererei, wenn man die Motive 3 und 4 entfernt, so wie bei ARF3
- Im Gegensatz zu dem distinkten Komplex
- Die Kombination der Antikörper (12CA5 oder 3F10) führt zu einem supershifted Komplex, wie bei ARF3 auch
- Gekürzte Formen der Motive 3 und 4 von ARF2, ARF5 und ARF6 zeigten verschmierte Banden im Gegensatz zu distinkten Komplexen in

## Bindung einiger ARFs

- ARF3 und gekürzte Carboxyl Formen von ARF2, ARF5, ARF6 und ARF8 weisen daraufhin, dass diese Komplexe nicht sehr stabil sind
- Carboxyl-terminale Motive 3 und 4 sind sehr wichtig für die stabile Verbindung
- Anti HA Epitope Antikörper, auf Grund ihrer zweideutigen, kompensierten Natur, können den Verlust der Motive 3 und 4 kompensieren und den ARFs erlauben zu dimerisieren und stabil an das Palindrom TGTCTC AuxRE zu binden

## Bindung einiger ARFs





Diskusion

- Neue Mitglieder der ARF-Familie in Arabidopsis identifiziert
- ARF1 bis ARF10 enthalten konservierte aminoterminal Domänen, die sich über 350 AS ausdehnen
- Diese Domäne ist ausreichend für ARF1 an TGTCTC zu binden
- DBD ist einmalig in Pflanzen und umfasst mehr als 120 AS, als zusätzliche

## Die ARF Multigen Familie

- # VP1
- In Mais, ähnliche Proteine identifiziert
  - Deren Abscisinsäure als Hormonantwort bei der Embryonalentwicklung wirkt
  - In VP1, einer carboxyl-terminalen B3 Domäne
  - Hoch konserviert in VP1 ähnlichen Proteinen
  - Verwandt mit ARF1 DBD
  - Das die Sequenz der DNA spezifisch bindet

# Die ARF Multigen Familie

- Zusätzliche Proteine in Arabidopsis gefunden
- Enthalten Sequenz verwandten Teil von DBD in ARF1 und B3 Domäne in VP1
- Spezifische Bindung hat bewiesen das sie mit DBD verwandt sind

## Die ARF Multigen Familie

- ARFs, mit der Ausnahme ARF 3, enthalten ein CDT mit Motiv verwandten Motive 3 und 4, in dem Aux/IAA Protein
- Die Aux/IAA Protein Familie hat mehr als 15 Mitglieder in Arabidopsis und viele sind codiert durch das primarily/early Auxin response Gene
- CTD in ARFs und Aux/IAA Proteinen sind wichtig für die Assoziation zwischen den beiden

# Die ARF Multigen Familie

- ARF Mittelregion zwischen dem Amino-terminalen DBD und CTD Motiv 3 und 4 ist nicht sehr konserviert
- Aktivierungsdomäne bei ARF5 und ARF6
- Hemmungsdomäne bei ARF7, ARF8 und ARF1
- ARFs kommen im gleichen Maße in Wurzeln, oberirdisches Gewebe und in Zellkulturen vor

# Die ARF Multigen Familie

- ARF Gene sind in fast allen Hauptorganen der adulten Pflanze zu finden
- Genauso wie in kultivierten und undifferenzierten Zellen
- ARFs mit der ähnlichen DNA-target-sites sind in einigen Zellen zur selben Zeit vorhanden
- Andererseits ist es möglich, dass es nur wenige Zell- oder Gewebespezifische Unterschiede im Expressionsmuster für verschiedene ARFs gibt

# Die ARF Multigen Familie

- Innerhalb bestimmter Pflanzenorgane ist die Genexpression auf einige Zellen oder Entwicklungsabschnitte begrenzt
- Dies wurde bei ARF3/ETTIN und bei ARF5/IAA24/MONOPTEROS gezeigt
- Daraus folgt das dies bei ARF3 und ARF5/IAA24 identisch sind



# ETTIN Gene

- Werden nur im inflorescence Meristem exprimiert und bestimmt durch das florale Meristem
- Entwickelt sich als florales Gewebe und leitet zudem auch noch florale und vasculäre Gewebe ein und wird dann auch dort exprimiert

# Monopteros

- Exprimiert werden sie in subepidermalen Zellen von jungen globulären Embryos
- Aber die Expression ist begrenzt durch differenziert vasculäre Stränge in der späteren stufenweise Embryonalentwicklung

# Die ARF Multigen Familie

- Dies deutet darauf hin das ARF3 und ARF5 nicht in allen Zellen und Gewebetypen expriemiert werden
- Dies kann darauf hindeuten das sie eine wesentlich Rolle in der Entstehung und Entwicklung von vaskulären Strängen spielen
-

# ARF Multigen Familie

- ARFs könnten Aktivitätsgene sein, die bei der Antwort zur Lokalisation eine Rolle spielen
- Die Aktivität nimmt mit zunehmender Auxin Konzentration in den vaskulären Geweben zu
- Mutationen in den MONOPTERES Genen behindern die Entstehung der vaskulären Stränge in der Embryonalentwicklung

# ARF Multigen Familie

- Experimente haben suggeriert das Auxin eine Schlüsselrolle in der vaskulären Gewebeentwicklung und Differenzierung spielt
- Es kann sein das eine minimale Funktion der ARFs für die vaskuläre Entwicklung bei den targeting primary/early Auxin response Genen bei der vaskulären Strukturierung und Entwicklung

# ARF Multigen Familie

- Auxin Gene unterstützen nicht selbst die primary/early response Gene, da sie die mRNA Synthese nicht steigern können, egal wieviel Auxin zugeben wird

- ARF1 bis ARF6 und ARF8 binden spezifisch an das TGTCTC Element im Palindrom AuxRE
- Ähnlich zu ARF1 und ARF5
- Wegen den feinen Unterschieden können Identifizierungen an den Positionen +5 und +6 im TGTCTC Element bei verschiedenen ARF Familien Mitgliedern vorgenommen werden

## ARF DBD und DNA Bindungs- Eigenschaften

- Es können viele verschiedene Typen von ARFs in ein und der selben Zelle vorliegen
- Es ist aber noch nicht klar, welche Parameter (ausser die ARF Konzentration) erforderlich sind um AuxRE zu binden

ARF DBD und DNA Bindungs-  
Eigenschaften



- Natürliche TGTCTC AuxREs können aus zusammengesetzten Elementen bestehen
- Bestehend aus einer einzelnen TGTCTC half site, diese liegt angrenzend oder überlappend mit einem konstitutiven oder gekoppelten Element
- Es ist möglich, dass diese konstitutiven/gekoppelten Elemente die Bindung des ARF an das AuxRE beeinflussen

**ARF DBD und DNA Bindungs-  
Eigenschaften**

- Einfache Palindrom AuxRe wurden auch in natürlichen Elementen des primary/early Auxin response Genen gefunden
- In diesen Fällen muss noch etwas anderes die konstitiven/gekoppelten Faktoren beeinflussen
- Wenn mehr als ein Typ von ARF in der Zelle vorliegt

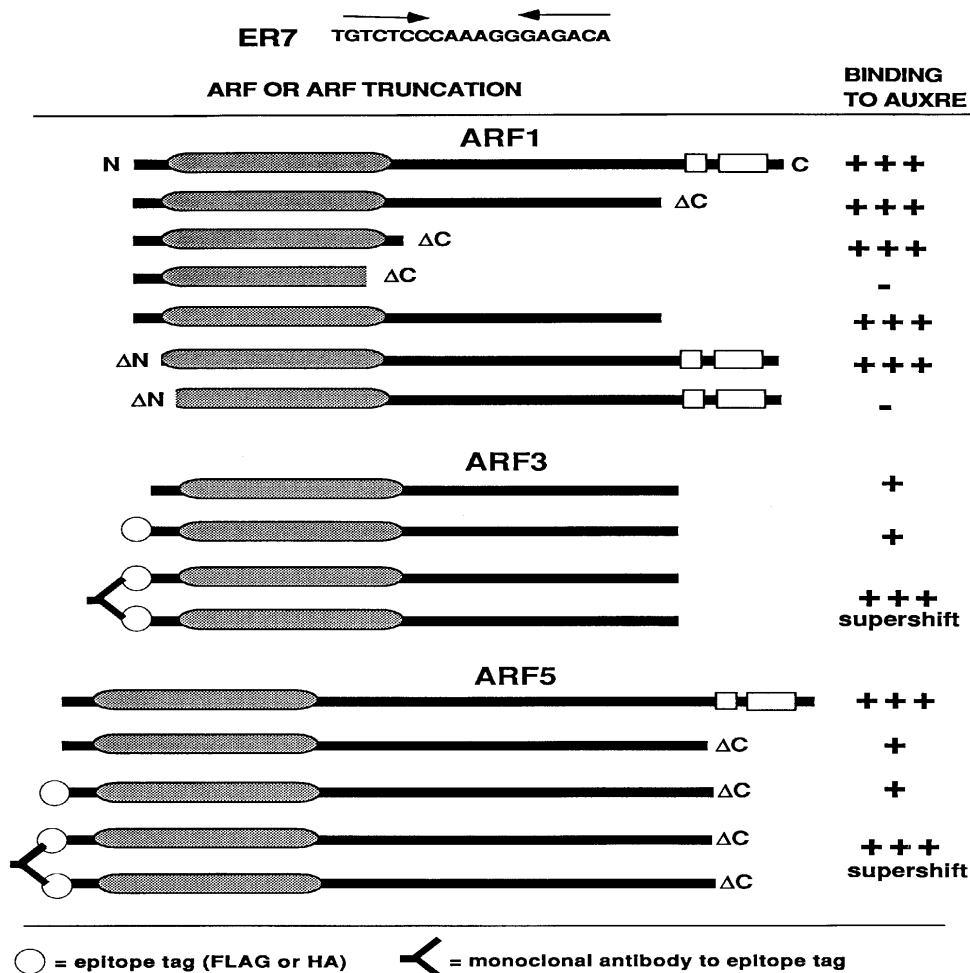
## ARF DBD und DNA Bindungs-Eigenschaften

- ARF3 fehlt es an der CTD Dimerisierungs Domäne und es kann keine effektive Bindung an einfache AuxREs mehr statt finden, dies erfordert einen gekoppelten Faktor für die spezielle Zusammensetzung des AuxREs
- Die Bindung von ARFs an das Palindrom TGTCTC AuxRE wird stabilisiert, wenn ein ARF mit einem anderen dimerisiert

## ARF DBD und DNA Bindungs-Eigenschaften

# ARF DBD und DNA Bindungseigenschaften

- Vorraussetzung für die effektive Bindung von ARF1, ARF3 und ARF5 an das Palindrom AuxRE



# ARF DBD und DNA Bindungs-Eigenschaften

- Die Abbildung fast die Bindungen für ARF1, ARF3 und ARF5 an das ER7 Palindrom AuxRE
- Es scheint die Bindung an das Palindrom zu erleichtern, wenn eine Protein-Protein-Interaktions-Domäne existiert, bestehend aus einem Carboxyl-terminalen Motiv 3 und 4
- ARF3 fehlt es an diesen Motiven und somit auch an der stabilen Bindung am Palindrom AuxRE

- Experimente aus Hefe-2-Systemen haben gezeigt das ARFs mit anderen ARFs und mit AUX/IAA Proteinen assoziieren und diese Interaktion wird erleichtert durch die Motive 3 und 4
- Diese Motive wurden in CDTs der beiden ARFs und AUX/IAA Proteinen gefunden
- Diese Interaktion deutet an, dass eine stabile

Hefe Experiment (in vivo)

- Das Palindrom AuxRE ist nicht nur bei hoher Syntheseaktivität vertreten (z.B. ER7)
- Sie wurden auch in natürlichen Promotoren gefunden, als PS-IAA4/5

ARF DBD und DNA Bindungs-  
Eigenschaften

- ARF1 bindet auch ohne die Motive 3 und 4 stabil an das Palindrom TGTCTC
- Und es bindet stärker an das Palindrom AuxRE als an die half site von TGTCTC
- Da es ähnlich dem AFR1 DBD ist und damit die Dimerisierung erleichtert
- Solche Dimerisierungs-Domänen könnte meherer effiziente Funktionen haben, als andere ARF DBDs

## ARF DBD und DNA Bindungs-Eigenschaften



- In einigen Fällen binden ARF Dimere besser als ARF Monomere
- Trotzdem erleichtert die Dimerisierung von Motiv 3 und 4 im CTD die Bindung oder bei Epitop-tag die Kombination mit einem Anti-Epitop-Antikörper
- Es zeigt sich ein ARF Gen Expressions Muster, die eine Sequenz spezifische Bindung an das TGTCTC AuxRE aufweist

## ARF DBD und DNA Bindungs-Eigenschaften

- Homo- und Heterodimerisierung am Palindrom, deutet darauf hin das die Regulation der Auxin induzierbaren Genexpression sehr Komplex ist
- Da ARF mRNAs immer expriemiert werden, in adulten Pflanzenorganen und Zellkulturen, ist es möglich, dass es mehrere Typen von ARF Funktionen gibt
- An ein und dem selben Auxin response Genen oder an verschieden, in ein und der selben  
→ ..

## ARF DBD und DNA Bindungs-Eigenschaften

- Auxin induzierte Promotoren beinhalten ein zusammengesetztes AuxRE, was sehr häufig als Palindrom AuxRE wirkt
- Diese Kombinationen sind aber begrenzt
- ARF Monomere binden nicht so effizient an TGTCTC AuxREs so wie ARF Dimere
- 

ARF DBD und DNA Bindungs-  
Eigenschaften

- Die Dimerisierung von Motiv 3 und 4 führt bei ARFs und AUX/IAA Proteinen zu einer verschieden förmigen Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren vom primary/early Auxin response Genen
- Motiv 3 und 4 können in ARF spezifische Interaktionen zwischen den Transkriptionsfaktoren unterschützen
- Diese entscheiden welche ARFs binden an der

ARF DBD und DNA Bindungs-  
Eigenschaften

- Carboxyl-terminale Motive von beiden ARFs und AUX/IAA Proteine können auch an der Interaktion der potenziellen Aktivierung oder Hemmung bei TGTCTC AuxRE
- Es ist möglich das diese Motive Interaktionen fördern können
- Dies wird benötigt für den Kern-Import von einigen ARFs und/oder AUX/IAA Proteinen
- Auf Lebenszeit modulieren diese die noch instabilen AUX/IAA Proteine oder ARF/AUX/IAA Koomplexe welche das DNA targeting von  
**ARF DBD und DNA Bindungs-  
Eigenschaften**

- Auf Lebenszeit modulieren diese die noch instabilen AUX/IAA Proteine oder ARF/AUX/IAA Koomplexe welche das DNA targeting von ARFs
- 

ARF DBD und DNA Bindungs-  
Eigenschaften

# Fazit

- Wir haben erfahren das ARF Proteine dimerisieren können und so besser an das Palindrom AuxRE binden
- Welche ARFs mit einander dimerisieren ist noch nicht klar

# Aktuelles Modell 1999